THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

PAR

Louis FREYSZ

LICENCIÉ ÈS-SCIENCES

ATTACHÉ DE RECHERCHE AU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

DISTRIBUTION ET RENOUVELLEMENT DES PHOSPHATIDES DU SYSTÊME NERVEUX CENTRAL : EVOLUTION AU COURS DE L'ONTOGENÈSE

SOUTENUE LE 4 JUIN 1969 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M M. J. P. EBEL Président

J. POLONOVSKI
J. H. WEIL
P. MANDEL
} Examinateurs

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

PAR

Louis FREYSZ

LICENCIÉ ÈS-SCIENCES

ATTACHÉ DE RECHERCHE AU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

DISTRIBUTION ET RENOUVELLEMENT DES PHOSPHATIDES DU SYSTÊME NERVEUX CENTRAL : EVOLUTION AU COURS DE L'ONTOGENÈSE

SOUTENUE LE 4 JUIN 1969 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M M. J. P. EBEL Président

J. POLONOVSKI
J. H. WEIL
P. MANDEL
} Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes parents

En modeste témoignage de ma reconnaissance

A ma femme

Témoignage de mon affection

A mes frères

A mes amis.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A notre Maître,

Monsieur le Professeur MANDEL.

Nous sommes fier de nous compter parmi ses élèves. La constante sollicitude et les encouragements renouvelés de cet éminent maître ont favorablement influencé l'exécution de ce travail. Son appui matériel et moral et sa bienveillance qu'il nous a prodigués nous ont permis d'estimer ses hautes qualités humaines.

Profondément conscient de ce que nous lui devons, nous le prions de trouver ici l'hommage de notre sincère reconnaissance et de notre respectueuse gratitude.

A Monsieur BIETH

Il a éveillé notre orientation et nous lui devons toute notre formation biochimique. Sa bienveillance et sa profonde compréhension ont ouvert et consolidé notre voie dans la recherche scientifique. C'est grâce à lui que ce travail a été entrepris et mené à bien, et son appui quotidien nous a permis de surmonter bien des difficultés.

Qu'il trouve ici l'expression de notre respectueux attachement et de notre sincère amitié.

FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Doyen: Professeur J.H. VIVIEN

Doyens honoraires: A. KIRRMANN, P. LACROUTE, H.J. MARESQUELLE, G. MILLOT.

Professeurs honoraires: P. DE BEAUCHAMP, L. BOISSELET, H. CARTAN, G. CERF, C. CHABAUTY, A. CHRETIEN, J. DENY, Ch. EHRESMANN, M. FRECHET, Mle S. GILLET, A. HEE, R. HOCART, A. KIRRMANN, G. LEMEE, P. L'HERITIER, A. LICHNEROWICZ, L. NEEL, Ch. SADRON, E. TERROINE, H. VILLAT, H. WEISS, Et. WOLFF, J. YVON.

Maître de Conférences Honoraire: R. WEIL

Professeurs:

H.J. MARESQUELLE.....	T.	Biologie végétale
H. FORESTIER.....	T.	Chimie générale
J. ROTHE.....	T.	Physique du Globe
P. LACROUTE.....	T.	Astronomie
J.H. VIVIEN.....	T.	Zoologie et Embryologie expérimentale
A. MAILLARD.....	T.	Physicochimie du Pétrole
S. GORODETZKY.....	T.	Physique générale et Physique nucléaire
L. SACKMANN.....	T.	Mécanique des Fluides
J. BYE.....	T.	Chimie Physique
R. LOMBARD.....	T.	Chimie organique
Mle M. PEREY.....	T.	Chimie nucléaire
S. GOLDSZTAUB.....	T.	Minéralogie et Pétrographie
P. JOLY.....	T.	Biologie générale
H. BENOIT.....	T.	Physicochimie macromoléculaire
P. CUER.....	T.	Physique générale et physique corpusculaire
G. MILLOT.....	T.	Géologie et Paléontologie
R. LECOLAZET.....	T.T.P.	Physique du Globe
H. SAUCIER.....	T.T.P.	Minéralogie
R. ROHMER.....	T.	Chimie minérale
Mle A. GAGNIEU.....	T.T.P.	Botanique
S. NIKITINE.....	T.	Physique générale
F. STUTINSKY.....	T.	Physiologie générale
B. WURTZ.....	T.T.P.	Chimie biologique
J. BRENET.....	T.	Electrochimie
G. OURISSON.....	T.T.P.	Chimie
A. COCHE.....	T.T.P.	Physique nucléaire
R. CERF.....	T.	Physique générale
J. FRENKEL.....	T.T.P.	Mathématiques
P. TAGLANG.....	T.	Physique
J.P. LONCHAMP.....	T.T.P.	Physique
A. DELUZARCHE.....	T.T.P.	Chimie
J.B. DONNET.....	T.T.P.	Chimie Physique
R. ARMBRUSTER.....	T.T.P.	Physique

A. ROCHE.....	T.T.P.	Physique du Globe
L. HIRTH.....	T.	Microbiologie
A. SIGOT.....	P.S.C.	Zoologie
A. FUCHS.....	T.	Mécanique rationnelle
A. GALLMANN.....	T.T.P.	Physique
P. MIALHE.....	T.T.P.	Physiologie animale
J.P. EBEL.....	T.	Chimie biologique
J. PARROD.....	T.T.P.	Chimie
R. WEY.....	T.T.P.	Chimie
Mme D. MAGNAC.....	T.T.P.	Physique
M. DAUNE.....	P.S.C.	Physique
J.P. ADLOFF.....	T.T.P.	Chimie nucléaire
D. BERNARD.....	T.T.P.	Méthodes mathématiques de la physique
E. DANIEL.....	T.	Physique expérimentale
P. CHEVALLIER.....	T.	Physique
J. GREMILLARD.....	T.T.P.	Mécanique des Fluides
P. CARTIER.....	T.	Mathématiques
G. REEB.....	T.	Topologie
R. CHAUVIN.....	T.	Psychophysiologie
J. TUCHER.....	P.S.C.	Physique
Mme BRINI M.....	P.S.C.	Chimie
R. BARO.....	P.S.C.	Physique
H. DURANTON.....	P.S.C.	Botanique
R. WEISS.....	T.T.P.	Chimie
P. FEDERLIN.....	T.T.P.	Chimie
J. LERAY.....	P.S.C.	Physique
J.P. SCHWING.....	P.S.C.	Chimie
M. SIESKIND.....	P.S.C.	Physique
G. MONSCNEGO.....	T.	Physique théorique
P. GABRIEL.....	T.T.P.	Mathématiques
C. WIPPLER.....	T.	Physicochimie des Hauts Polymères industriels
P.A. MEYER.....	T.T.P.	Mathématiques
G. WEILL.....	P.S.C.	Physique
J.M. BLOCH	T.	Chimie
A. CLAUSS.....	P.S.C.	Chimie
E. FOLLENIUS.....	P.S.C.	Zoologie
J. LUCAS.....	P.S.C.	Géologie
J.J. THIEBOLD.....	P.S.C.	Biologie animale
G. GLAESER.....	T.	Mathématiques
J.H. WEIL.....	P.S.C.	Chimie biologique
D. FOATA.....	P.S.C.	Mathématiques

Professeurs associés:

A. BANDERET (E.A.H.P.) - R. CLELAND (Physique) - G. PEROLD (Chimie) - J. SAMPSON (Mathématiques).

Maîtres de Conférences:

H. DANAN.....	Physique
Mme WINTER Chr.....	Physique
J.P. EBERHART.....	Minéralogie
Mme D. CAGNIANT.....	Chimie
X. FERNIQUE.....	Mathématiques

J. STREITH..... Chimie
F. GAUTIER..... Physique propédeutique
G. SUTTER..... Physique électronique
J.M. LEHN..... Chimie
Cl. ROBERT..... Physique
Fr. LACROUTE..... Biologie végétale
A. GIRARDIE..... Biologie animale
M. GOUNOT..... Botanique
J. DEHAND..... Chimie minérale
J. PRADINES..... Mathématiques
F. BECKER..... Physique mathématique
M. KAROUBI..... Mathématiques
A. MIGNOT..... Mathématiques appliquées
R. VOLTZ..... Physique théorique
A. MICHARD..... Géologie
J.M. GIRAUD..... Mathématiques
Y. BOULANGER..... Chimie biologique
D. DACUNHA-CASTELLE.... Mathématiques
J.P. BRETAGNOLLE..... Mathématiques

Maîtres de Conférences associés:

V. AVANISSIAN (Mathématiques) - J. APSIMON (Chimie) - R. CAIROLI (Mathématiques) - E. DADE (Mathématiques) - H. GOLDWHITE (Chimie) - G. LETTA (Mathématiques) - G. RINEHART (Mathématiques) - M. SZYMONA (Chimie biologique).

Secrétaire général de la Faculté: G. SAINT-PE

SOMMAIRE

Pages

ABREVIATIONS XI

AVANT-PROPOS XII

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE: METHODES ET TECHNIQUES

A) CHOIX DES ANIMAUX 5

B) CONDITIONS EXPERIMENTALES 6

1) Technique d'injection du $^{32}PO_4'''$ 6

2) Sacrifice des animaux 6

C) METHODES D'EXTRACTION ET DE FRACTIONNEMENT DES PHOSPHOLIPIDES 6

1) Technique d'extraction des lipides 6

2) Méthode de fractionnement des phosphatides 7

a) Chromatographie sur colonne de silice 8

b) Chromatographie sur papier formolé 10

c) Chromatographie sur colonne de DEAE cellulose 11

d) Techniques d'hydrolyse ménagée: séparation des composés d'hydrolyses 12

e) Techniques de révélation et d'identification des phospholipides 13

D) METHODES DE DETERMINATION DES DIVERS PHOSPHOLIPIDES. 13

1) Fractionnement et détermination quantitative des divers phospholipides. 13

a) Détermination des cardiolipides 14

b) Détermination des phosphatidyl-inositols, des phosphatides à sérine et des phosphatides à éthanolamine. 14

c) Détermination des phosphatidyl-cholines, des plasmalogènes à choline et des sphingomyélines 15

d) Détermination des phosphatidyl-inositols phosphate et des phosphatidyl-inositols diphosphate 16

2) Fractionnement des phosphatides en vue de la mesure de leurs activités spécifiques 16

E) TECHNIQUES ANALYTIQUES. 18
1) Dosage du phosphore organique 18
2) Dosage du phosphore minéral 19
3) Dosage de l'inositol 20
4) Détermination des plasmalogènes 20
5) Dosage du cholestérol 20
6) Dosage de l'azote protéique 21
7) Dosage des acides nucléiques 21
8) Détermination de la radioactivité 22
9) Détermination de l'activité de l'anhydrase carbonique 22

F) NUMERATION ET DETERMINATION DU TAUX DE NEURONES ET DE CELLULES GLIALES 22

G) EXPRESSION DES RESULTATS 23

DEUXIEME PARTIE: RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE I: METHODOLOGIE 24

A) EXTRACTION DES LIPIDES 24

B) MISE AU POINT D'UNE METHODE QUANTITATIVE ET DE DETERMINATION DES POLYPHOSPHOINOSITIDES 26

C) MISE AU POINT D'UNE METHODE D'ISOLEMENT DE FRACTIONS ENRICHIES EN NEURONES ET EN CELLULES GLIALES 35

CHAPITRE II: RYTHME DE LA BIOSYNTHESE DES PHOSPHATIDES DU SYSTEME NERVEUX AU COURS DE SON DEVELOPPEMENT. 39

A) DEVELOPPEMENT BIOCHIMIQUE DU CERVEAU DE RAT
a) Introduction 41
b) Acide desoxyribonucléique 42
c) Proteines 43
d) Lipides 43
e) Phosphatides 44
f) Discussion 50

B) DEVELOPPEMENT BIOCHIMIQUE DU CERVEAU DE POULET
a) Introduction 42
b) Acide desoxyribonucléique 51
c) Protéines 54
d) Lipides 58
e) Phosphatides 61
f) Discussion 62
C) SIGNIFICATION DES VARIATIONS INTERVENANT DANS LA BIOSYNTHESE DES DIVERS PHOSPHOLIPIDES AU COURS DE L'ONTOGENESE DES CERVEAUX DE RATS ET DE POULETS 66
CHAPITRE III: INCORPORATION DU $^{32}PO_4'''$ DANS LES PHOSPHOLIPIDES DU CERVEAU DE RAT 70
A) ETUDE CINETIQUE DU RENOUVELLEMENT DES DIVERS PHOSPHOLIPIDES DU CERVEAU DE RAT ADULTE 70
B) ETUDE DE L'INCORPORATION DU $^{32}PO_4'''$ DANS LES PHOSPHOLIPIDES AU COURS DE LA CROISSANCE DU CERVEAU DE RAT 77
CHAPITRE IV: ETUDES DES PHOSPHOLIPIDES DU CERVEAU DE RAT A L'ECHELLE CELLULAIRE. 88
A) ETUDE COMPAREE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DES NEURONES ET DES CELLULES GLIALES DU CORTEX CEREBRAL DE RAT. 89
B) ETUDE COMPAREE DE LA DISTRIBUTION DES DIVERS PHOSPHOLIPIDES DANS LES NEURONES ET LES CELLULES GLIALES DU CORTEX CEREBRAL DE RAT 92
C) ETUDE DE L'INCORPORATION DU $^{32}PO_4'''$ DANS LES PHOSPHOLIPIDES DES NEURONES ET DES CELLULES GLIALES DU CORTEX CEREBRAL DE RAT 96
D) CONCLUSIONS GENERALES SUR L'INCORPORATION DU $^{32}PO_4'''$ DANS LES PHOSPHOLIPIDES DU CERVEAU DE RAT. 102
RESUME ET CONCLUSION 107
BIBLIOGRAPHIE 114

ABREVIATIONS

ADN	Acide desoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
CTP	Cytidine triphosphate
MPI	Phosphatidyl-inositols
DPI	Phosphatidyl-inositols phosphate
TPI	Phosphatidyl-inositols diphosphate
C	Chloroforme
MOH	Méthanol
N	Azote
P	Phosphore
PO_4'''	Ion phosphate
DEAE cellulose	Diéthyl amino-éthyl cellulose
g	gramme
mg	milligramme
µg	microgramme
pg	picogramme
µ	micron
M	molaire
µmoles	micromoles
µC	microcurie
A.S.	Activité spécifique (coups/minute/ug P)
A.S.R.	Activité spécifique relative au phosphate inorganique.

AVANT - PROPOS

Les recherches qui ont fait l'objet de ce travail ont été poursuivies au Centre de Neurochimie de la Faculté de Médecine de Strasbourg sous la direction de notre Maître Monsieur le Professeur P. MANDEL et dans l'équipe de Monsieur R. BIETH, Ingénieur Chimiste, Docteur-ès-Sciences, Chef de Travaux à la Faculté de Médecine. Que Monsieur BIETH sache que sa coopération quotidienne et sa bienveillante sympathie ont permis l'aboutissement de ce travail.

Nos plus vifs remerciements vont à Monsieur le Professeur J.P. EBEL pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant la Présidence de cette Thèse.

Notre profonde gratitude s'adresse à Monsieur J. POLONOVSKI, Professeur à la Faculté de Médecine de Paris, qui est notre parrain depuis notre nomination au C.N.R.S.. Nous lui sommes profondément reconnaissant d'avoir accepté d'examiner et de juger le présent travail.

Nous remercions également Monsieur le Professeur J.H. WEIL qui a bien voulu accepter d'examiner ce travail.

Notre reconnaissance s'adresse à Mademoiselle M. JACOB, Maître de Recherche au C.N.R.S., pour les conseils amicaux qu'elle nous a prodigués au cours de notre travail.

Notre gratitude va également à Mademoiselle M. SENSEN-BRENNER, Docteur-ès-Sciences et Monsieur Ch. JUDES, Licencié-ès-Sciences qui nous ont aimablement prêté leur concours pour la réalisation du fractionnement cellulaire.

C'est nous acquitter d'un bien agréable devoir que de remercier Monsieur G. REBEL, Docteur-ès-Sciences dont nous avons pu apprécier la grande culture biochimique et son remarquable esprit critique.

Il nous tient particulièrement à coeur de remercier ici nos collaboratrice techniques successives: Madame Ch. ENGELMANN et Madame Ch. SCHOEN, dont la contribution à ce travail nous a été précieuse.

Nos remerciements vont également à Mademoiselle S. MAECHLER qui, très amicalement, a apporté son concours à la présentation définitive de ce travail.

Notre reconnaissance s'adresse enfin, au C.N.R.S. qui a rendu possible ce travail de recherche.

INTRODUCTION

Le métabolisme du système nerveux doit répondre à des exigences multiples et complexes.

Du point de vue morphologique, les cellules nerveuses présentent des caractéristiques spécifiques qui les distinguent de toutes autres cellules. Elles sont, en effet, pourvues d'expansions parfois très longues (les dendrites et les axones) qui leur permettent d'assumer la transmission de l'influx nerveux. Au cours de la différenciation apparaissent deux types majeurs de cellules: "les neurones et les cellules gliales". Parmi elles on trouve encore une différenciation à la fois morphologique et fonctionnelle. Il en résulte une hétérogéité qui rend difficile l'étude des corrélations entre le métabolisme et le fonctionnement du cerveau tant sur le plan technique que sur celui de l'interprétation des résultats. De plus, le cerveau doit assurer lui-même la synthèse de molécules de structures relativement stables et de molécules fonctionnelles d'une existence éphémère car la "barrière hémato-cérébrale" ne laisse guère passer que des ions, du glucose et des acides aminés.

Sur le plan biochimique, le tissu nerveux présente également des caractéristiques tout à fait particulières. Ainsi le cerveau possède la teneur en lipides la plus élevée qui soit, en dehors du tissu adipeux, et parmi ces lipides les phosphatides constituent environ les deux tiers, alors que les triglycérides n'existent qu'à un taux extrêmement faible.

Bien que la découverte des phosphatides par VAUQUELIN (214, 215) remonte à 1811, c'est surtout depuis les travaux de THUDICHUM(209, 210) datant de la fin du XIXè siècle que la chimie des phosphatides du cerveau a fait de grands progrès. Cet auteur isole de nombreuses fractions phospholipidiques qu'il essaye de classer après une analyse minutieuse. Il reconnaît l'existence de trois catégories de phospholipides: les céphalines, les lécithines et les sphingomyélines. La recherche sur les phosphatides passe ensuite par une phase de latence jusqu'aux environs des années 30, période sur laquelle nous ne nous étendrons pas. Pour de plus amples détails, nous renvoyons le lecteur à l'excellente bibliographie de WITTCOFF (229) ainsi que celle de ANSELL et HAWTHORNE (9). Vers 1940, la chimie des phosphatides prend un nouvel essor par la découverte des plasmalogènes (FEULGEN et BERSIN, 79) et des phosphatides à éthanolamine, à sérine et à inositol (FOLCH, 76). C'est surtout grâce à la mise au point de techniques nouvelles de fractionnement, telle que la chromatographie sur alumine ou sur silice (93, 128, 151, 159) et les techniques d'hydrolyse (49) que les connaissances sur la structure des phosphatides progressent rapidement. Ce n'est cependant que récemment que HÖRHAMMER et coll. (105) ainsi que GRADO et BALLOU (88) ont rapporté l'existence des polyphosphoinositides.

Bien qu'il existe à l'heure actuelle un grand nombre d'informations sur le métabolisme des phosphatides cérébraux

rapporté notamment par BRANTE (23), SLOANE-STANLEY (201), Mc ILLWAIN (158), Le BARON et FOLCH-PI (130), ROSSITER (188) HAELD (92) et ANSELL et HAWTHORNE (9) il persiste de nombreuses lacunes dont certaines seront envisagées dans le présent travail.

Les phospholipides étant essentiellement localisés dans des structures membranaires, il faut admettre que lors du fonctionnement du système nerveux chaque phosphatide joue un rôle biologique qui lui est propre et qui dépend de sa structure d'une part et de sa localisation subcellulaire d'autre part. C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés aux phospholipides du cerveau.

Un des problèmes essentiels posé à la biochimie du Système Nerveux consiste à étudier le rapport entre la structure et l'activité métabolique de cet organe d'une part et son activité fonctionnelle d'autre part. Diverses approches à ce problème ont été envisagées et divers modèles d'études choisis. Nous avons considéré qu'une confrontation entre la maturation fonctionnelle et l'évolution des divers phosphatides du Système Nerveux Central pourrait apporter des éléments utiles.

Deux modèles essentiels du développement du cerveau existent chez les animaux supérieurs. Le développement indépendant tel qu'il s'effectue dans l'embryogénèse des animaux ovipares et celui qui subit la physiologie maternelle, comme c'est le cas chez les mammifères. Nous avons choisi dans

chaque catégorie un représentant: le Rat pour les mammifères et le Poulet pour les ovipares.

Dans le cas du Rat, les connaissances des divers phosphatides du cerveau au cours du développement étaient incomplètes: les documents concernant les cardiolipides, les divers phosphoinositides et les phosphatidyl-sérines étaient absents.

De plus, les études durant l'ontogénèse restaient liées à l'analyse quantitative de certains constituants et se préoccupaient rarement de l'activité des synthèses à chaque étape. Nous avons estimé utile de combler cette lacune en étudiant l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les diverses étapes du développement cérébral.

En ce qui concerne le développement du cerveau de Poulet, nous disposions seulement de données globales sur l'ensemble des phospholipides. Il nous a semblé intéressant de préciser l'évolution individuelle de chaque type de phosphatide et de la comparer à celle du cerveau de Rat afin d'en déduire d'éventuelles lois communes.

Enfin, nous avons abordé l'étude des phospholipides à l'échelle cellulaire. Dans ce cadre nous avons estimé utile d'examiner tout d'abord la distribution des divers phospholipides dans différents types de cellules: les Neurones et les Cellules gliales. Dans une deuxième étape nous nous sommes intéressés à l'activité métabolique de ces constituants. De cette façon il nous est possible dans certaines limites, de faire la part des phénomènes métaboliques qui revient aux divers types de cellules.

PREMIERE PARTIE

METHODES ET TECHNIQUES

Nous rapporterons dans ce chapitre les méthodes et les techniques que nous avons empruntées à la littérature sans y apporter de grandes modifications. Dans le chapitre suivant, nous exposerons les techniques ayant fait l'objet de recherches et de mises au point personnelles.

A) Choix des animaux.

Nos recherches sur le développement biochimique du système nerveux central ont porté sur deux espèces animales: le Poulet et le Rat. La biosynthèse des divers phosphatides au cours de la croissance du cerveau de Poulet a été étudiée au cours de la vie embryonnaire, période la plus importante du développement cérébral et au cours de la vie post-natale. La différenciation du système nerveux central de l'embryon offre des conditions d'études particulièrement favorables, car l'embryon, enfermé dans sa coquille, vit uniquement au dépend des réserves de l'oeuf, ce qui élimine toute intervention de facteurs alimentaires exogènes et réduit ainsi le nombre des inconnues pouvant influencer son développement. L'ensemble de ces études a porté sur des sujets de race Leghorn L 12 d'un âge variant du 7è jour de la vie embryonnaire à 18 mois après l'éclosion.

Dans le cas du Rat, nos essais ont porté sur des individus de souche Wistar d'un âge compris entre 1 jour et 6 mois. Cette souche est génétiquement très homogène par suite des croisements répétés entre individus d'une même portée.

B) Conditions expérimentales.

1) Technique d'injection du phosphate radioactif.

Chez le Rat, le phosphate radioactif a été injecté par voie intrapéritonéale sous forme de Na_2HPO_4 à raison de 400 µC pour 100 g de poids corporel. En vue de l'étude cinétique de l'incorporation du précurseur radioactif dans les phospholipides de l'adulte, les animaux sont sacrifiés à des intervalles de temps allant de 3 heures à 30 jours après l'injection. Pour les études portant sur l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les phosphatides au cours de la croissance, les animaux sont sacrifiés 48 heures après administration du précurseur marqué.

2) Sacrifice des animaux.

Les animaux sont toujours sacrifiés par décapitation et les cerveaux immédiatement prélevés et congelés. Lors des études sur les polyphosphoinositides, composés très labiles, les têtes sont plongées immédiatement dans l'azote liquide après le sacrifice, puis lyophilisées pour éviter toute dégradation de ces composés.

C) Méthodes d'extraction et de fractionnement des phospholipides.

1) Technique d'extraction des lipides.

Les lipides sont extraits dans les conditions décrites par FOLCH (80). Après broyage du tissu frais ou lyophilisé dans le mélange chloroforme-méthanol 2:1, l'extraction se fait par agitation pendant 30 minutes dans un volume de solvant égal à 20 fois le poids de substance. Après filtration,

on répète deux fois l'opération sur le résidu, la troisième extraction se faisant à 40°. Les diverses solutions lipidiques sont rassemblées et lavées par agitation avec 20 p. 100 d'eau. Après séparation des deux phases, la phase supérieure et l'interphase renfermant une partie des protéolipides sont éliminées par décantation et la phase inférieure relavée par 20 p. 100 de phase supérieure de FOLCH (chloroforme-méthanol-eau 3:48:47 (80)). La phase aqueuse est décantée et la phase chloroformique évaporée sous vide à une température n'excédant pas 40°. Le résidu sec est ensuite repris par du chloroforme, filtré pour en séparer les parties insolubles et complété à volume connu. Cette solution lipidique sert au fractionnement et à la détermination des divers phosphatides.

Enfin, le résidu d'extraction des lipides est conservé pour la détermination des protéines et des acides nucléiques.

2) Méthodes de fractionnement des phosphatides.

Quatre types de procédés ont été utilisés pour le fractionnement des divers phospholipides:

a) La chromatographie sur colonne de silice

b) La chromatographie sur colonne de DEAE cellulose

c) La chromatographie sur papier formolé

d) Les techniques d'hydrolyse ménagée (alcaline et acide) suivies, si nécessaire, d'une chromatographie sur papier en vue de fractionner les glycérylphosphoryldérivés hydrosolubles.

a) Chromatographie sur colonne de silice.

Nous utilisons la silice Mallinkrodt 200 Mesh. Avant utilisation, elle est activée pendant 30 minutes à 110°. Une suspension de silice dans le méthanol sert à former la colonne. Après tassement de la silice dans la colonne, le méthanol est chassé par du chloroforme afin d'obtenir la forme utilisée pour le fractionnement des phosphatides. Il est important de traiter préalablement la silice par le méthanol afin d'éviter toute dégradation possible des plasmalogènes. Nous avons montré qu'après traitement de la silice au méthanol, on n'observe aucune hydrolyse de ces composés. Notons que WREN (231) aboutit aux mêmes conclusions lors d'une étude de la chromatographie des lipides sur colonne de silice.

La chromatographie sur colonne de silice nous permet de fractionner les phosphatides en trois groupes. Dans ce but, nous utilisons deux types de colonnes suivant la quantité de matériel disponible.

- Cas de macroquantités: quantités de P lipidique supérieures à 1 mg (Fig. I).

Dans ce cas, nous utilisons des colonnes d'un diamètre de 16 mm renfermant 20 g de silice, ce qui donne une hauteur de colonne de 20 cm. Une partie aliquote de la solution lipidique renfermant 1 à 4 mg de P lipidique est appliquée sur la colonne. La colonne est ensuite lavée par 100 ml de chloroforme pour éliminer les lipides neutres. Nous procédons à l'élution des divers phospholipides par des mélanges chloroforme-méthanol à concentration croissante en méthanol. On recueille

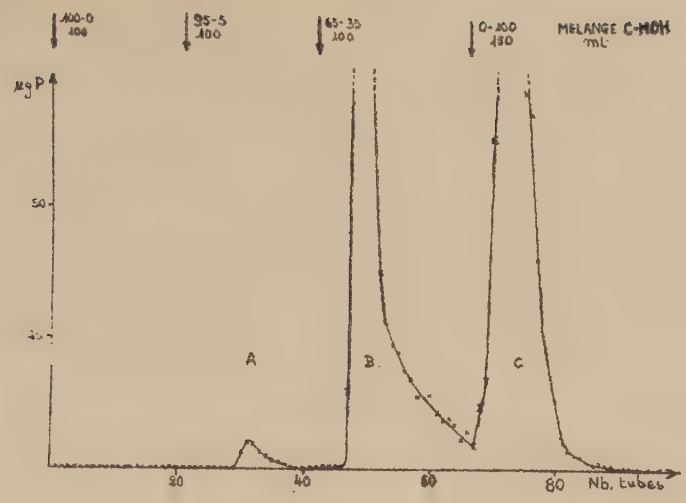


FIGURE I. - Chromatographie sur colonne de silice d'un extrait lipidique de cerveau renfermant 1 à 4 mg de P lipidique.

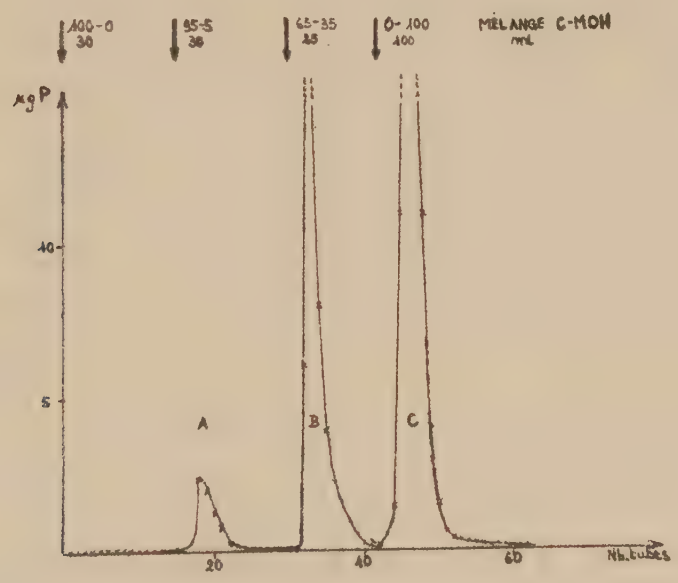


FIGURE II. - Chromatographie sur colonne de silice d'un extrait lipidique de cerveau renfermant moins de 0,5 mg de P lipidique.

ainsi une fraction A après élution par 100 ml de mélange chloroforme-méthanol 95:5, une fraction B éluée par 100 ml de mélange chloroforme-méthanol 65:35 et une fraction C obtenue après élution par 150 ml de méthanol pur.

- Cas de microquantités: quantités de P. lipidique inférieures à 0,5 mg (Fig. II).

Lorsque le matériel disponible n'excède pas 500 µg de P lipidique, le fractionnement est réalisé sur des colonnes de silice de diamètre plus petit (5 mm) préparées avec 2,5 g de silice traitée comme précédemment. Pour l'élution des phospholipides, nous employons les mêmes solvants, mais en quantités plus faibles. On utilise successivement:

30 ml de chloroforme pour éliminer les lipides neutres

30 ml de chloroforme-méthanol 95:5 pour éluer la fraction A

25 ml de chloroforme-méthanol pour éluer la fraction B et

100 ml de méthanol pour éluer la fraction C.

Nous avons montré que dans chaque cas l'élution des divers phospholipides est quantitative et de l'ordre de 95 à 105 p. 100.

L'analyse par chromatographie sur papier formolé de chaque fraction montre que la fraction A renferme les cardiolipides et éventuellement des traces d'acides phosphatidiques (Fig. III). Les fractions B et C par contre, sont fort hétérogènes. La fraction B renferme les phosphatides à éthanolamine (phosphatidyl, plasmalogènes et éther-phosphatides à éthanolamine), les phosphatides à sérines (phosphatidyl et plasmalogènes à sérine) et les phosphatidyl-inositols (Fig. III et IV).

Enfin, la fraction C renferme les phosphatides à choline (phosphatidyl et plasmalogènes à choline et les sphingomyélines) (Fig. III et IV).

Les fractions B et C sont fractionnées ultérieurement, soit par chromatographie sur papier formolé, soit par chromatographie sur colonne de DEAE cellulose, soit par les techniques d'hydrolyse ménagée. Au cours de la chromatographie sur colonne de silice, les polyphosphoinositides sont élués partiellement avec la fraction B et la fraction C. Nous discuterons ultérieurement de l'influence de ces composés sur la détermination des divers phospholipides.

b) Chromatographie sur papier formolé.

La chromatographie sur papier formolé selon HÖRHAMMER et WAGNER (109, 221), permet de séparer les différents phosphatides de la fraction B obtenue lors du fractionnement des phosphatides sur colonne de silice. Dans ce but, nous procédons à une chromatographie descendante utilisant comme solvant la phase supérieure du mélange butanol-acide acétique-eau (4:1:5) (Fig. IV). Dans certaines expériences les cardiolipides ont été isolés à partir de l'extrait lipidique total par chromatographie ascendante à l'aide du solvant tétrahydrofuranne-diisobutylcétone-eau (45:5:6) (Fig. III).

Dans chaque cas, on révèle une bande témoin en la plongeant dans une solution de bleu de Nil à 0,1 p. 100. L'excédent de colorant est éliminé par lavage de la bande sous eau courante. Les zones correspondant aux divers spots sont décou-

Révélation du P

1) témoin cardiolipide
2) fraction A
3) fraction B
4) fraction C

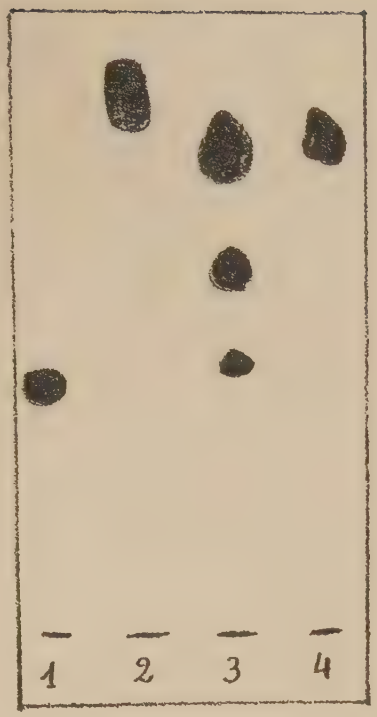
Révélation à la ninhydrine

1) témoin cardiolipide
2) fraction A
3) fraction B
4) fraction C

Révélation LEVINE CHARGRAFF

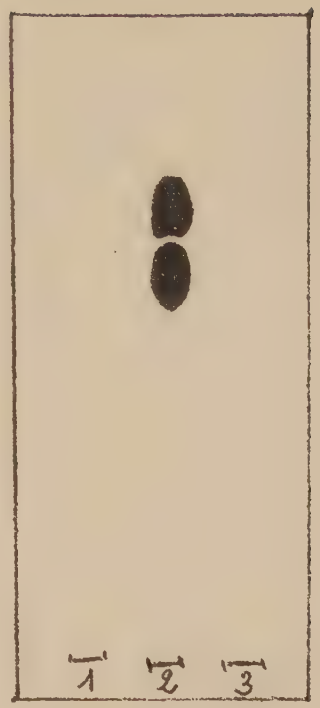
1) fraction A
2) fraction B
3) fraction C

FIGURE III. - Chromatographie ascendante sur papier formole. Solvant : tétrahydrofurane : diisobutylcétone : eau (45:5:6, v/v/v).



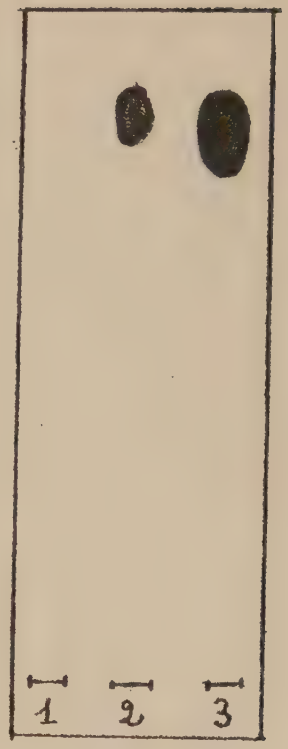
Révélation du P

1) témoin MPI
2) fraction A
3) fraction B
4) fraction C



Révélation à la ninhydrine

1) fraction A
2) fraction B
3) fraction C



Révélation de LEVINE CHARGAFF

1) fraction A
2) fraction B
3) fraction C

FIGURE IV. - Chromatographie descendante sur papier formole. Solvant : phase supérieure du mélange alcool butyrique : acide acétique : eau (4:1:5, v/v/v).

pées et calcinées au four dans le cas des cardiolipides et des phosphatidyl-inositols. Les cendres servent au dosage du P. Parallèlement, on détermine le P apporté par le papier. Les spots des phosphatides à sérines et éthanolamines renfermant un mélange de diacyl, vinyl-éther et alkyl-éther dérivés sont élués du chromatogramme trois fois par le mélange chloroforme-méthanol 2:1 à 50° pendant 30 minutes. La séparation de ces divers composés lors des études d'incorporation de P marqué est ensuite réalisée par les méthodes d'hydrolyses.

c) Chromatographie sur colonne de DEAE cellulose.

La chromatographie sur colonne de DEAE cellulose (ROUSER et coll., 190, 191) n'a été employée que pour les déterminations quantitatives des plasmalogènes à sérine. Nous utilisons les colonnes d'un diamètre de 16 mm renfermant 10 g de DEAE cellulose sous forme acétate. L'excédent d'acide acétique est éliminé par du méthanol et le méthanol par du chloroforme.

Nous portons sur la colonne une partie aliquote de la fraction B. A l'aide de 350 ml de méthanol on élimine les phosphatides "neutres" (phosphatides à éthanolamine), puis on élue les phosphatides "acides" (phosphatides à sérine et monophosphoinositides) par 350 ml de mélange chloroforme-méthanol (4:1)-ammoniaque-acétate d'ammonium (980 ml:20 ml:0,05 M). Parmi ce groupe de phospholipides ceux à sérine sont les seuls présentant une fonction vinyl-éther; ainsi la détermination des plasmalogènes à sérine se fait directement sur cette frac-

tion sans fractionnement ultérieur. Nous avons d'ailleurs montré qu'on trouve le même taux de plasmalogènes à sérine lorsqu'on isole les phosphatides à sérine par chromatographie sur papier formolé.

d) Techniques d'hydrolyses ménagées: séparation des composés hydrosolùbles.

Les hydrolyses ménagées (alcaline ou acide) permettent le fractionnement des phosphatides renfermant la même base et ayant donc des comportements chromatographiques similaires (phosphatidyl-dérivés, plasmalogènes, éther-phosphatides). Les techniques d'hydrolyses utilisées au cours de nos recherches sont celles mises au point dans notre laboratoire par REBEL, BIETH et MANDEL (179) pour la détermination de la sphingomyéline et celles de DAWSON (52), DAWSON, HEMINGTON et DAVENPORT (53) ou de WELLS et DITTMER (226) pour le fractionnement des phosphatidyl-dérivés, des plasmalogènes et des éther-phosphatides.

Dans les expériences où il n'a pas été procédé à un fractionnement préalable des phosphatides sur colonne de silice ou sur papier formolé, les produits d'hydrolyse obtenus après hydrolyse alcaline ou acide ménagée sont fractionnés par chromatographie sur papier dans les conditions décrites par DAWSON (52) à l'aide du solvant phénol saturé d'eau-alcool éthylique-acide acétique (100:12:10).

e) Techniques de révélation et d'identification des phospholipides.

Dans le but de localiser et d'identifier les divers phospholipides fractionnés par chromatographie sur papier formolé, nous utilisons quatre types de procédés:

- le bleu de Nil (91) qui révèle tous les lipides
- la détection du phosphore par la méthode de HANES et ISHERWOOD modifiée (72) qui permet de localiser sélectivement les phosphatides.
- la révélation à la ninhydrine (159) qui est spécifique des phospholipides présentant une fonction amine (phosphatides à éthanolamine et à sérine).
- le réactif de LEVINE et CHARGAFF (137) pour localiser les phosphatides à choline (phosphatidyl-cholines et sphingomyélines). Ce réactif n'est pas absolument spécifique et réagit également avec les phosphatides à éthanolamine (119, 192).

D) Méthodes de détermination des divers phospholipides.

Ayant décrit l'ensemble des techniques utilisées pour la séparation des divers phospholipides, nous exposerons ici les diverses étapes du fractionnement et de la détermination de chaque phosphatide au cours des études quantitatives et métaboliques.

1) Fractionnement et détermination quantitative des divers phospholipides.

La solution lipidique I obtenue par extraction au chloroforme-méthanol selon FOLCH (80) est complétée à volume connu et sert à la détermination des lipides totaux par gravimétrie, du

P lipidique total, du plasmalogène total et du cholestérol.

a) Détermination des Cardiolipides.

Une partie aliquote de la solution I est fractionnée par chromatographie sur colonne de silice, comme nous l'avons mentionné plus haut.

La fraction A qui renferme les cardiolipides est directement soumise à un dosage de phosphore après minéralisation. Nous ne tenons pas compte du P apporté par les acides phosphatidiques présents dans cette fraction,ces composés ne se trouvant qu'à l'état de traces dans le tissu nerveux et pouvant être considérés comme négligeables par rapport aux cardiolipides.

b) Détermination des monophosphoinositides, des phosphatides à sérine et des phosphatides à éthanolamine.

Sur la fraction B obtenue après chromatographie sur colonne de silice, on détermine le phosphore total et les plasmalogènes totaux. Une partie aliquote de cette fraction est ensuite soumise à une chromatographie descendante sur papier formolé. Les spots correspondant aux phosphatides à sérines et aux monophosphoinositides sont découpés, puis calcinés. Les cendres servent au dosage du P. Une autre partie de la fraction B est chromatographiée sur colonne de DEAE cellulose. La fraction éluée par le mélange chloroforme-méthanol (4:1)-ammoniaque-acétate d'ammonium (980:20:0,05 M) est recueillie et sert au dosage des plasmalogènes à sérine. Enfin, une dernière partie aliquote est soumise à une hydrolyse alcaline ménagée (KOH 0,4 N) suivie d'une hydrolyse

acide ménagée HCl 0,1 N - TCA N) (179). L'insaponifiable obtenu sert à la détermination des éther phosphatides par dosage du P. La défalcation du taux des plasmalogènes à sérine de ceux de la fraction B fournit le taux des plasmalogènes à éthanolamine. De même, on évalue le taux des phosphatidyl-sérines par différence entre le P des phosphatides à sérines et celui des plasmalogènes correspondant et le taux des phosphatidyl-éthanolamines par différence entre le P de la fraction B et la somme des P des phosphatidyl-inositols des phosphatidyl-sérines, des plasmalogènes à sérine et à éthanolamine et des éther-phosphatides.

c) Détermination des phosphatidyl et phosphatidal-cholines et des sphingomyélines.

La fraction C éluée de la colonne de silice par le méthanol renferme les phosphatidyl-cholines, les plasmalogènes correspondants et les sphingomyélines. Sur cette fraction on détermine le P total et les plasmalogènes. Une partie aliquote de cette fraction sert à la détermination des sphingomyélines selon REBEL et coll. (179). La différence entre le P total de la fraction C et la somme du P des plasmalogènes à choline et des sphingomyélines fournit la valeur du P des phosphatidyl-cholines.

Au cours de la détermination de l'ensemble de ces divers phosphatides, nous ne tenons pas compte du P apporté par les polyphosphoinositides. Ces quantités de phosphatides seront incluses dans celles calculées par défalcation des divers phospholipides des phosphatides totaux de la fraction

B et C, donc dans les phosphatidyl-éthanolamines et cholines. Or, le taux des polyphosphoinositides n'excède pas 1,6 p. 100 des phospholipides totaux et leur extraction est incomplète dans les conditions expérimentales employées au cours de cette étude, comme nous le verrons plus loin. Aussi les quantités de polyphosphoinositides peuvent-elles être considérées comme négligeables à côté des deux phosphatidyl-dérivés dont le taux est le plus élevé dans le tissu nerveux.

d) Détermination des diphosphoinositides et triphosphoinositides.

Le fractionnement des polyphosphoinositides se fait à partir de l'extrait initial par chromatographie sur papier formolé. L'extraction de ces composés ayant posé un problème particulier, nous reviendrons en détails sur leur détermination dans le chapitre suivant.

2) Fractionnement des phosphatides en vue de la mesure de leurs activités spécifiques.

Lors des études quantitatives il n'a pas toujours été nécessaire d'isoler les divers phospholipides à l'état pur en vue de leur dosage, étant donné que nous possédons des techniques de dosages spécifiques de l'un ou l'autre composé, comme p. ex. pour les plasmalogènes. Les études sur le renouvellement et le métabolisme de ces mêmes phosphatides à l'aide de phosphate radioactif nécessitent par contre, l'isolement à l'état pur de chacun des phospholipides, ou du moins de leur groupement phosphoré. Aussi la marche du fractionnement des divers phosphatides a-t-elle été légèrement modifiée.

La solution lipidique I est chromatographiée sur colonne de silice et les phospholipides séparés en trois fractions comme précédemment.

La fraction A est soumise à une chromatographie ascendante sur papier formolé à l'aide du solvant tétrohydrofurane-acide acétique-eau (45:5:6) pour séparer le cardiolipide de traces d'acide phosphatidique dont le renouvellement est très intense (49, 50). Après localisation des cardiolipides par révélation au bleu de Nil d'une bande témoin, les spots sont découpés, calcinés au four et sur les cendres on détermine le phosphore et la radioactivité.

La fraction B est rechromatographiée sur papier formolé utilisant comme solvant la phase supérieure du mélange alcool butylique-acide acétique-eau (4:1:5). Comme pour les cardiolipides, les spots correspondant aux monophosphoinositides sont calcinés au four et sur les cendres on détermine les activités spécifiques. Les spots correspondant aux phosphatides à sérine et à éthanolamine contenant les diacyldérivés, les vinyléther-dérivés et les éther-dérivés sont élués par le chloroforme-méthanol 2:1 et soumis à une hydrolyse alcaline douce (NaOH 0,1 N dans 1 ml de mélange chloroforme-méthanol 1:4) selon WELLS et DITTMER (226) qui saponifie les diacyl-composés en glycérolphosphoryl-dérivés hydrosolubles. Après neutralisation du milieu réactionnel par 0,15 ml d'acide acétique N, on ajoute 2 ml de chloroforme-méthanol 9:1, 1 ml d'alcool butylique et 2 ml d'eau. Le mélange est agité vigou-

reusement et centrifugé. On obtient ainsi deux phases: une phase supérieure aqueuse renfermant les glycérylphosphoryl-dérivés et une phase inférieure chloroformique contenant les phosphatides insaponifiables. On procède ensuite à une hydrolyse acide douce (HCl 0,01 N - $HgCl_2$ 0,005 M) des phosphatides alcalistables qui a pour but de saponifier les plasmalogènes en glycérylphosphoryl-dérivés. Comme précédemment, on sépare les glycérylphosphoryl-dérivés de l'insaponifiable par un mélange biphasique. Les phosphatides insaponifiables représentent les éther-phospholipides et seul les phosphatides à éthanolamine contiennent ce type de composés. Sur chaque fraction ainsi obtenue on détermine le phosphore et la radioactivité.

La fraction C est soumise successivement à l'hydrolyse alcaline et acide comme précédemment. On sépare ainsi la glycérylphosphoryl-choline provenant des diacyldérivés, celle provenant des plasmalogènes et les sphingomyélines et sur chaque fraction on détermine les activités spécifiques.

E) Techniques analytiques.

1) Dosage du phosphore organique.

La détermination quantitative des divers phospholipides a été effectuée dans la plupart des cas par dosage du phosphore, après minéralisation des phosphatides par le mélange acide sulfurique-perhydrol. Les techniques les plus employées pour le dosage du phosphate inorganique sont photocolorimétriques. Toutes reposent sur sa transformation en phosphomo-

lybdate d'ammonium, qui donne une coloration bleue par la formation d'un sous-oxyde de molybdène en présence d'un réducteur. De nombreuses variantes techniques portant sur le pH, et surtout la nature de l'agent réducteur, existent dans la littérature. Dans notre cas particulier deux méthodes ont été sélectionnées. La première, celle de BRIGGS (24) modifiée par MACHEBOEUF et DELSAL (141) permet le dosage de 10 à 60 µg de phosphore. Pour la détermination de quantités de 0,5 à 5 µg la technique de CHEN (33) s'est révélée très sensible et très reproductible. Les densités optiques des solutions colorées obtenues sont évaluées à l'aide d'un photomètre JOUAN à longueur d'onde de 820 mµ.

2) Dosage du phosphore minéral.

En vue de la détermination des activités spécifiques du phosphate minéral, une partie aliquote de l'homogénat cérébral est traitée par 5 volumes d'acide perchlorique 0,6 N à 0°. Après centrifugation de la suspension on recueille le surnageant, puis le culot est remis en suspension dans l'acide perchlorique 0,6 N. On procède ainsi à deux extractions successives de l'acido-soluble et on rassemble les diverses solutions. La détermination du phosphore et de son activité spécifique a été réalisée soit après précipitation sous forme de phosphate ammoniaco-magnésien selon la technique de LOHMAN (139), soit dans les expériences où les quantités de phosphates disponibles étaient faibles, après extraction selon la technique de MARTIN et DOTY (155). Le dosage du phosphate inorganique et la mesure de la radioactivité ont toujours été réalisés sur le même échantillon.

3) Dosage de l'inositol.

Au cours des expériences d'analyses qualitatives le dosage de l'inositol parallèlement à celui du phosphore, a servi de test pour l'identification des divers phosphoinositides séparés par chromatographie sur papier. Le dosage de l'inositol a été effectué par oxydation périodique selon la technique de BÖHM et RICHARZ (21).

4) Détermination des plasmalogènes.

Deux techniques ont été employées pour la détermination des plasmalogènes suivant les quantités de matériel disponible. Dans les expériences où les quantités sont supérieures à 1 µM, les plasmalogènes ont été dosés par la méthode iodométrique de RAPPORT et ALONZO (177) qui a l'avantage d'être très rapide. Pour les faibles quantités nous utilisons le procédé de WITTENBERG, KOREY et SWENSON (230) qui dose les aldéhydes libérés après hydrolyse acide par condensation avec la para-nitrophénylhydrazine. Ce procédé tout en étant long, a l'avantage d'être très sensible et permet de doser des quantités de plasmalogènes de l'odre de 0,1 µM.

5) Dosage du cholestérol.

Le cholestérol total est dosé sur l'extrait lipidique initial I par la méthode de LIEBERMAN (138).

Par cette technique, on dose l'ensemble du cholestérol libre et estérifié. Cependant, les quantités de cholestérol estérifié présent dans le système nerveux sont très faibles,

comparées au taux élevé de cholestérol libre (18, 89). Aussi les valeurs obtenues peuvent-elles être considérées comme revenant au cholestérol libre.

6) Dosage de l'azote protéique.

Le résidu de l'extraction lipidique sert à la détermination des protéines par dosage de l'azote par la technique au micro-Kjeldahl après minéralisation d'une partie aliquote par le mélange acide sulfurique-perhydrol.

7) Détermination des acides nucléiques.

Elle se fait sur le résidu de l'extraction lipidique qui est d'abord traité deux fois par l'acide perchlorique 0,6 N à 0° pour éliminer les composés acido-solubles non extraits par le chloroforme-méthanol 2:1. Après centrifugation, on décante le surnageant. Le dosage des acides ribonucléiques et desoxyribonucléiques est basé sur le principe de la technique de SCHMIDT et THANNHAUSER (194) avec quelques modifications (228): hydrolyse par la potasse N/2 à 37° pendant 15 heures et séparation par précipitation à l'acide perchlorique de la fraction desoxyribonucléique insoluble de la fraction ribonucléique soluble. L'ion perchlorique est ensuite éliminé par la potasse à froid. L'ARN est déterminé dans la fraction ribonucléique soluble par le dosage du ribose des nucléotides provenant de l'hydrolyse de l'ARN selon la technique de MEJBAUM (163, 164)basée sur la réaction de BIAL.

La fraction de l'hydrolysat alcalin contenant l'ADN est hydrolysée par l'acide perchlorique N pendant 20 minutes à 70° pour libérer le désoxyribose. Après centrifugation, on détermine sur le surnageant le désoxyribose par la méthode de DISCHE (57) modifiée par BURTON (30) qui rend la réaction à la diphénylamine plus sensible et plus spécifique.

8) Détermination de la radioactivité.

Pour la détermination de la radioactivité, nous avons utilisé un compteur à cloche à fenêtre mince du type Nuclear Chicago. La mesure se fait en couche mince.

9) Détermination de l'activité de l'anhydrase carbonique.

La détermination de l'activité de l'anhydrase carbonique se fait directement sur les fractions cellulaires. A cet effet, les cellules sont déposées par centrifugation et les culots cellulaires homogénéisés dans de l'eau bidistillée à l'aide d'un appareil du type POTTER-ELVEJEHM (176) à piston en téflon afin de libérer l'enzyme. On détermine ensuite l'activité de l'anhydrase carbonique sur les suspensions ainsi obtenues par la méthode de MAREN (154).

F) Numération et détermination du taux de neurones et de cellules gliales.

Les fractions cellulaires enrichies en neurones ou en cellules gliales sont homogénéisés dans une solution de chlorure de sodium à 9 p. 1000. On en prélève une partie aliquote que l'on colore à l'aide d'une solution de bleu de méthylène à 0,1 p. 100 dans le sérum physiologique. Le comptage de la totalité des cellules a été effectué dans une cellule

de THOMA. Le comptage différentiel neurones/cellules gliales a lieu sur une goutte de la suspension entre lame et lamelle à l'immersion. Pour la reconnaissance des cellules, nous nous sommes basé sur la structure morphologique des noyaux caractéristique de chaque type cellulaire (167).

G) Mode d'expression des résultats.

Les résultats sont présentés le plus souvent sous forme de la moyenne arithmétique $\bar{X}$ des n valeurs X déterminées expérimentalement

$$\bar{X} = \frac{\Sigma X}{n}$$

Pour apprécier la dispersion, nous calculons l'écart-type S

$$S = \sqrt{\frac{(X - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Précédé du signe $\pm$, il accompagne la moyenne. Rappelons que pour une distribution normale, les 2/3 des résultats sont compris dans l'intervalle $\bar{X} \pm S$ et 95 p. 100 des résultats dans l'intervalle $\bar{X} \pm 2\ S$.

D E U X I E M E P A R T I E

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE I

Méthodologie

A) Extraction des lipides.

Avant d'aborder la discussion des résultats expérimentaux, il est indispensable de revenir sur quelques modifications apportées à certaines techniques et en particulier à la méthode d'extraction des lipides. Les divers auteurs qui s'intéressent aux problèmes des lipides ont élaboré des techniques d'extraction personnelles. On peut les classer en deux catégories:

1) Extraction directe des lipides sur tissu frais ou lyophilisé comme le préconisent FOLCH et coll. (80), BLIGH et DYER (20), SCHMIDT et coll. (203), ainsi que d'autres auteurs (64, 90, 181).

2) Précipitation des complexes lipides-protéines par l'acide trichloracétique, lavage à l'eau, traitement ou non à l'acétone et extraction du résidu par des solvants à chaud (4, 48).

Dans notre cas particulier le choix de la technique d'extraction devait répondre à deux critères:

1) Extraire quantitativement les lipides du cerveau

2) Eviter au maximum la formation d'artéfacts au cours de l'extraction.

Ceci nous a conduit à éliminer toutes les méthodes qui n'extraient pas directement les lipides du tissu pour éviter au maximum leur dégradation. Signalons que le traitement d'un tissu par l'acide trichloracétique avant l'extraction des lipides est à rejeter si on s'intéresse à l'étude des plasmalogènes, car la fonction vinyl-éther est hydrolysée par cet acide (152). De même, il nous a semblé préférable de ne pas utiliser des procédés d'extraction par des solvants bouillants qui peuvent altérer plus ou moins les molécules lipidiques (94).

Parmi l'ensemble des techniques d'extraction à froid, il s'agissait de choisir celle qui extrait le plus complètement les lipides des tissus. Comme la majeure partie des lipides existe sous forme de "complexes lipo-protéiques", il faut utiliser des solvants polaires tels que le méthanol ou l'éthanol pour rompre les liaisons lipides-protéines. Ces solvants sont toujours utilisés en mélange avec des solvants moins polaires (chloroforme-éther) pour obtenir une solubilisation parfaite de l'ensemble des lipides.

Notre choix s'est fixé sur le solvant de FOLCH et coll. (80) qui utilise le chloroforme-méthanol dans les proportions 2:1 à raison de 20 volumes par gramme de tissu et, afin d'épuiser au maximum le tissu en lipides,nous répétons l'opération trois fois; la troisième extraction se faisant à une température de 40°. Dans ces conditions les quantités de lipides que l'on arrive encore à extraire par des moyens plus brutaux tels que le mélange chloroforme-métahnol-HCl 12 N 200:100:1, sont inférieures à 0,5 p.100 des lipides extraits.

B) Mise au point d'une méthode quantitative d'extraction et de fractionnement des polyphosphoinositides.

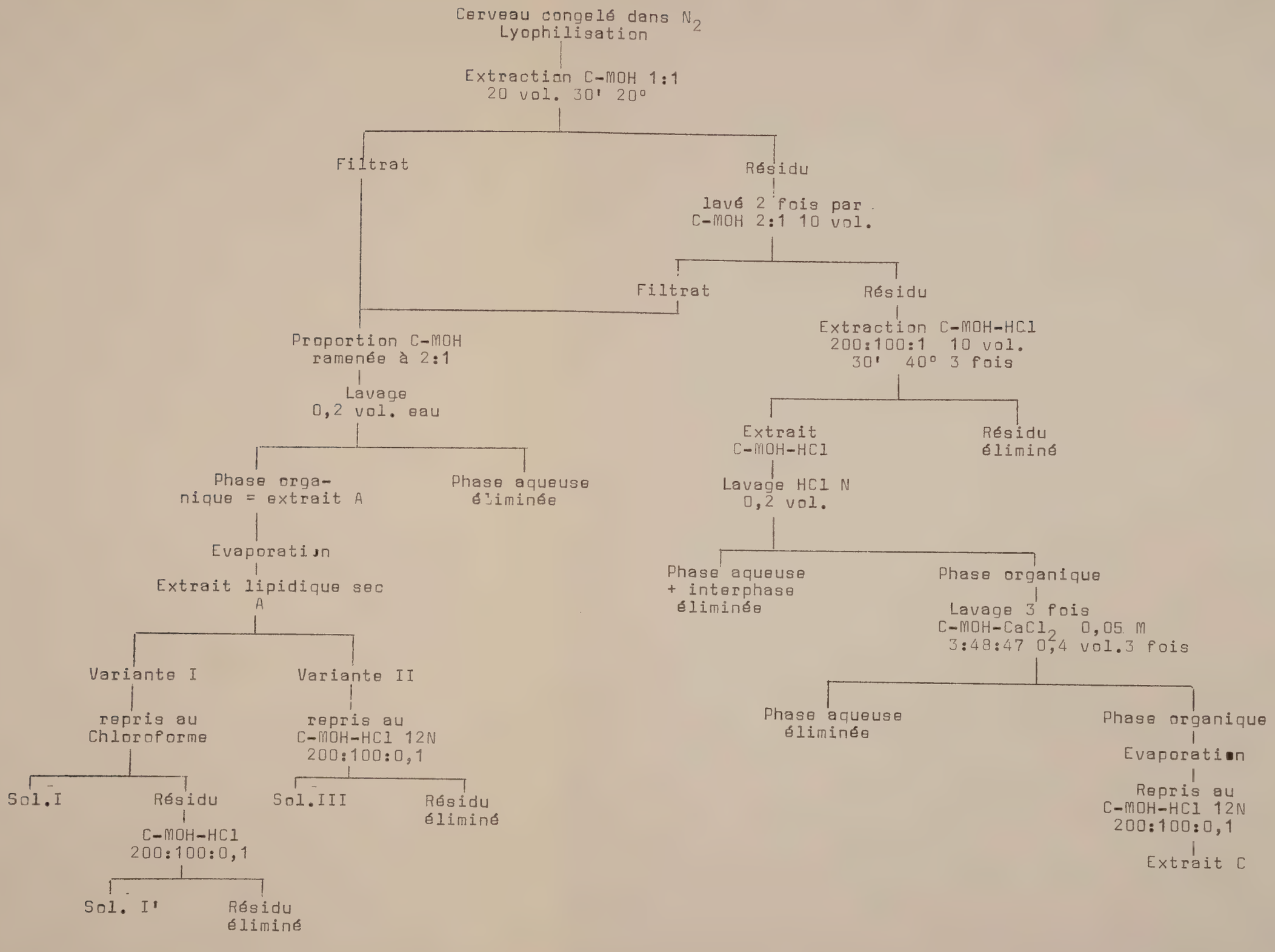
La présence de polyphosphoinositides dans le cerveau a été décrite pour la première fois par FOLCH en 1949 (77). Ces phosphatides extraits par des solvants classiques des lipides furent désignés sous le nom de "Diphosphoinositides" car leur hydrolyse libérait de l'inositol diphosphate. Des études plus récentes conduites par HÖRHAMMER et coll. (104, 105), HOKIN et HOKIN (101), ELLIS et HAWTHORNE (69), GRADO et BALLOU (88), TOMLISON et BALLOU (221), DITTMER et DAWSON (58) ont permis de montrer que la fraction "diphosphoinositides" isolée par FOLCH renferme en outre des monophosphoinositides et des triphosphoinositides. Ce sont surtout les travaux de BROCKERHOFF et BALLOU (27), de ELLIS, GAILLARD et HAWTHORNE (70) et de DITTMER et DAWSON (59) qui ont permis d'établir la structure de ces trois inositides. Par ailleurs, FOLCH (78) et Le BARON et FOLCH (129) ont isolé une fraction protéique résistant à la trypsine et contenant des polyphosphoinositides. Ces composés ne sont pas extractibles par les solvants classiques, mais uniquement par des mélanges acidifiés tel que le chloroforme-méthanol-HCl 12 N (200:100:1).

L'étude quantitative des phosphoinositides qui n'existent qu'à un taux très faible dans les divers tissus, s'est heurtée à de nombreuses difficultés. Il ressort des travaux de DITTMER et DAWSON (52), de DAWSON et EICHBERG (55) et de ROSSITER et PALMER (189) sur l'extraction des phosphoinositides, que les phosphatidyl-inositols sont solubilisés quanti-

tativement par le chloroforme-méthanol 2:1 ou 1:1, alors que les phosphatidyl-inositols phosphate et phosphatidyl-inositols diphosphate ne sont extraits par ce solvant que si le tissu est traité au préalable par de l'acétone. Par contre, ces composés sont facilement extraits par des solvants acides tels que le chloroforme-méthanol-HCl 12 N (200:100:1). Aussi ces auteurs suggèrent-ils de traiter d'abord le tissu par le mélange chloroforme-méthanol pour extraire l'ensemble des lipides autres que les polyphosphoinositides et ensuite de solubiliser ces derniers de façon sélective par le solvant chloroforme-méthanol-HCl 12 N (200:100:1). Cependant, WELLS et DITTMER (225), WAGNER et coll. (223), KAI et coll. (116), MANNUKYAN et coll. (146) ainsi que HAYASHI et coll. (99) ont signalé la présence de polyphosphoinositides dans des extraits lipidiques obtenus par les solvants neutres (chloroforme-méthanol 2:1 ou 1:1). Devant ces faits, il nous a semblé utile de reprendre l'étude systématique des conditions d'extraction de ces composés avant d'entreprendre des recherches sur leur rythme d'accumulation au cours du développement cérébral.

Les polyphosphoinositides étant des composés très labiles (59, 225, 99), les têtes sont immédiatement congelées dans l'azote liquide après décapitation de l'animal, puis lyophilisées, afin déviter au maximum la dégradation de ces composés. L'extraction des lipides est effectuée par agitation de la poudre de cerveau lyophilisée avec le mélange

SCHEMA A


Cerveau congelé dans N_2
Lyophilisation
Extraction C-MOH 1:1
20 vol. 30' 20°
Filtrat
Résidu
lavé 2 fois par
C-MOH 2:1 10 vol.
Filtrat
Résidu
Extraction C-MOH-HCl
200:100:1 10 vol.
30' 40° 3 fois
Proportion C-MOH
ramenée à 2:1
Lavage
0,2 vol. eau
Extrait
C-MOH-HCl
Résidu
éliminé
Phase orga-
nique = extrait A
Phase aqueuse
éliminée
Lavage HCl N
0,2 vol.
Evaporation
Extrait lipidique sec
A
Phase aqueuse
+ interphase
éliminée
Phase organique
Lavage 3 fois
C-MOH-$CaCl_2$ 0,05 M
3:48:47 0,4 vol. 3 fois
Variante I
Variante II
repris au
Chloroforme
repris au
C-MOH-HCl 12N
200:100:0,1
Phase aqueuse
éliminée
Phase organique
Evaporation
Repris au
C-MOH-HCl 12N
200:100:0,1
Extrait C
Sol.I
Résidu
Sol.III
Résidu
éliminé
C-MOH-HCl
200:100:0,1
Sol. I'
Résidu
éliminé

SCHEMA B

Cerveau congelé dans N_2
Lyophilisation

Extraction C-MOH 2:1
20 vol. 30' 40° 2 fois

- Filtrat
- Résidu

Résidu → Extraction C-MOH 2:1
20 vol. 30' 40°

- Filtrat
- Résidu

Filtrat → Lavage
0,2 vol. eau

- Phase organique - extrait B → Evaporation → Extrait lipidique sec B
- Phase aqueuse éliminée

Extrait lipidique sec B

- Variante I → Repris au Chloroforme
  - Sol. II
  - Résidu → C-MOH-HCl 200:100:0,1
    - Sol.II'
    - Résidu éliminé
- Variante II → Repris au C-MOH-HCl 12N 200:100:0,1
  - Sol. IV
  - Résidu éliminé

Résidu → Extraction C-MOH-HCl
200:100:1 10 vol. 30'
40° 3 fois

- Extrait C-MOH-HCl → Lavage HCl N
0,2 vol.
  - Phase aqueuse + interphase éliminée
  - Phase organique → Lavage C-MOH-$CaCl_2$
0,05 M 3:48:47
0,4 vol. 3 fois
    - Phase aqueuse éliminée
    - Phase organique → Evaporation → Repris au C-MOH-HCl 12 N
200:100:0,1 → Extrait D
- Résidu

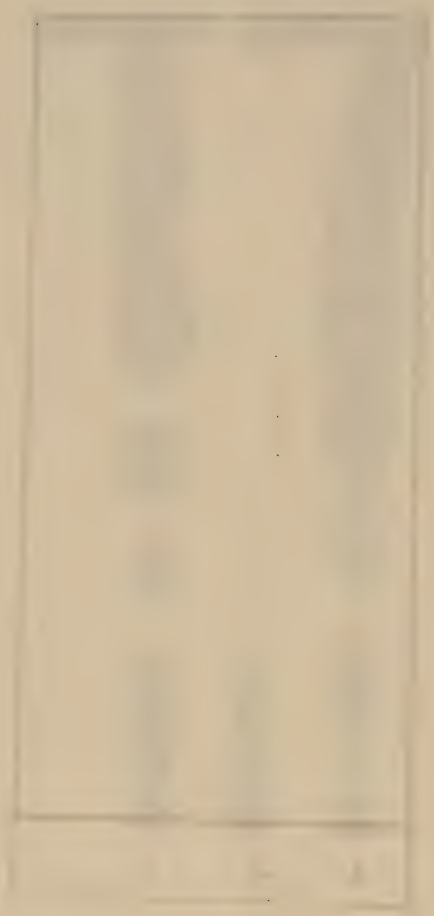
chloroforme-méthanol 1:1 ou avec le mélange chloroforme-méthanol 2:1. Les divers lavages des extraits se font par agitation avec une phase aqueuse suivis d'une décantation. Les détails du mode opératoire sont consignés dans les schémas A et B.

Les protéolipides se rassemblant sous forme de voiles à la limite de séparation des deux phases et renfermant des polyphosphoinositides (81, 156, 169), sont toujours gardés avec les phases organiques, sauf lors des lavages des extraits acides où les voiles se rassemblant à l'interphase ne contiennent plus de phosphoinositides (59, 189).

La séparation des diphosphoinositides et triphosphoinositides est effectuée par chromatographie descendante sur papier formolé à l'aide de la phase supérieure du solvant butanol-acide acétique-eau (4:1:5) selon les conditions décrites par HORHAMMER et coll. (105). On dépose environ 100 µg de P lipidique dans le cas des extraits neutres et 10 µg de P lipidique dans le cas des extraits acides (Fig.V). La localisation des spots est réalisée par coloration d'une bande témoin avec une solution de bleu de Nil comme nous l'avons décrit dans le chapitre "Techniques". Les divers spots ont été identifiés par comparaison avec la migration de substances témoins et par détermination du rapport $\frac{\text{Phosphore}}{\text{Inositol}}$ qui était en moyenne de 1,8 pour les diphosphoinositides et de 3,1 pour les triphosphoinositides. Les quantités d'inositides sont évaluées par dosage du P après découpage et calcination du spot. Nous indiquons à titre

1) Extrait lipidique chloroforme -méthanol (2:1, v/v).
2) Témoin de TPI.
3) Extrait lipidique chloroforme-méthanol-HCl (200:100:1, v/v/v).

FIGURE V. - Chromatographie descendante sur papier formolé d'un extrait lipidique total. Révélation : Bleu de Nil.



d'exemple la répartition des polyphosphoinositides dans les diverses fractions obtenues à partir du cerveau de Rat.

a) Inositides extraits par les mélanges chloroforme-méthanol neutres.

L'extrait lipidique A obtenu par extraction avec le mélange chloroforme-méthanol 1:1 est évaporé à sec, repris par le chloroforme et filtré pour en séparer les parties insolubles. Les quantités de diphosphoinositides et triphosphoinositides présents dans cette solution (I) sont en moyenne de 11,62 µg de P diphosphoinositides et de 10,98 µg de P triphosphoinositides par gramme de tissu frais (tableau I).

En opérant de la même façon avec l'extrait lipidique B obtenu par le mélange chloroforme-méthanol 2:1 et en procédant à une troisième extraction à chaud, on trouve dans la solution chloroformique (II) un taux de P diphosphoinositides de 15,84 µg et de P de triphosphoinositides de 19,90 µg par gramme de tissu frais, taux nettement supérieur à celui trouvé après extraction par le mélange chloroforme-méthanol 1:1 (Tableau I). L'extraction des polyphosphoinositides par le chloroforme-méthanol 2:1 est donc plus efficace que par le mélange chloroforme-méthanol 1:1 qui n'extrait respectivement que 73 et 55 p. 100 des quantités de diphosphoinositides et triphosphoinositides trouvées après traitement au chloroforme-méthanol 2:1.

En redissolvant les extraits lipidiques secs A et B dans le chloroforme, il reste un résidu insoluble renfermant des produits de dénaturation des protéolipides. En traitant

TABLEAU I

POLYPHOSPHOINOSITIDES DES EXTRAITS LIPIDIQUES I ET II DU CERVEAU DE RAT

Résultats exprimés en µg P/g de tissu frais.

	Extrait lipidique I Extrait C/MOH 2:1 - lipides repris au chloroforme		Extrait lipidique II Extrait C/MOH 2:1 - lipides repris au chloroforme	
EXP.	DPI	TPI	DPI	TPI
I	11,40	9,75	14,85	20,85
II	12,50	12,05	16,85	20,80
III	10,95	11,15	15,82	17,95
MOY.	11,62	10,98	15,84	19,90

TABLEAU II

POLYPHOSPHOINOSITIDES DES RESIDUS CHLOROFORMIQUES I' ET II' DU CERVEAU DE RAT

Résultats exprimés en µg P/g de tissu frais.

	Extrait lipidique I' Résidu chloroformique 1:1 repris au C/MOH/HCl 12N (200:100:0,1)		Extrait lipidique II' Résidu chloroformique 2:1 repris au C/MOH/HCl 12N (200:100:0,1)	
EXP.	DPI	TPI	DPI	TPI
I	0,76	1,30	1,80	1,42
II	1,39	1,21	1,32	1,61
III	1,13	0,87	1,63	1,58
MOY.	1,09	1,13	1,58	1,54

ces résidus par un mélange chloroforme-méthanol-HCl 200:100:0,1 et en soumettant la solution obtenue à une chromatographie sur papier formolé, on trouve encore des polyphosphoinositides. La solution I'correspondant à l'extrait A renferme par gramme de tissu frais 1,09 µg de P diphosphoinositides et 1,13 µg de P triphosphoinositides (Tableau II), alors que dans la solution II' obtenue à partir de la solution B, on trouve 1,58 µg de P diphosphoinositides et 1,54 µg de P triphosphoinositides (Tableau II). Il s'ensuit qu'une partie des inositides reste attachée au résidu des protéolipides. Dans ce cas encore, les quantités d'inositides obtenues après extraction par le chloroforme-méthanol 2:1 sont supérieures à celles fournies par traitement au mélange chloroforme-méthanol 1:1.

Si, au lieu de traiter les résidus d'évaporation des extraits A et B d'abord au chloroforme, puis par le mélange chloroforme-méthanol-HCl 12 N (200:100:0,1) on redissout les lipides directement dans le mélange chloroforme-méthanol-HCl 12 N (200:100:0,1), on obtient les solutions (III) à partir de l'extrait A et (IV) à partir de l'extrait B renfermant toutes deux des diphosphoinositides et des triphosphoinositides à un taux plus élevé que les solutions analysées précédemment (Tableau III). La teneur en P de diphosphoinositides est de 18,15 µg de P par gramme de tissu frais dans la solution III et de 23,34 µg de P par gramme de tissu frais dans la solution IV. En ce qui concerne les triphosphoinositides, nous trouvons par gramme de tissu frais 18,12 µg de P

TABLEAU III

POLYPHOSPHOINOSITIDES DES EXTRAITS LIPIDIQUES III et IV DU CERVEAU DE RAT

Résultats exprimés en µg P/g de tissu frais.

	Extrait lipidique III Extrait C/MOH 1:1 - Repris au C/MOH/HCl 12 N (200:100:0,1)		Extrait lipidique IV Extrait C/MOH 2:1 - Repris au C/MOH/HCl 12N (200:100:0,1)	
EXP.	DPI	TPI	DPI	TPI
I	18,05	20,90	22,20	36,10
II	14,50	19,00	25,90	29,60
III	21,90	14,45	21,90	28,15
MOY.	18,15	18,12	23,34	31,28

TABLEAU IV

POLYPHOSPHOINOSITIDES DES EXTRAITS LIPIDIQUES C et D DU CERVEAU DE RAT

Résultats exprimés en µg P/g de tissu frais.

	Extrait lipidique C Résidu extrait au C/MOH/ HCl 12N (200-100-1)		Extrait lipidique D Résidu extrait au C/MOH/ HCl 12N (200-100-1)	
EXP.	DPI	TPI	DPI	TPI
I	6,25	12,30	0,51	1,33
II	6,90	11,65	0,71	1,53
III	5,22	10,30	0,64	1,22
MOY.	6,12	11,42	0,62	1,26

dans la solution III et 31,28 µg de P dans la solution IV. On constate donc à nouveau que le mélange chloroforme-méthanol 2:1 fournit plus de polyphosphoinositides que le mélange chloroforme-méthanol 1:1.

Par ailleurs, les valeurs absolues en polyphosphoinositides dans chacune des solutions III et IV sont supérieures à la somme des inositides trouvées à partir des solutions obtenues en redissolvant le résidu de l'évaporation des extraits A et B successivement dans le chloroforme, puis dans le chloroforme-méthanol-HCl 12 N (200: 100: 0,1). En effet, à partir de l'extrait A on obtient par gramme de tissu frais 12,71 µg de P de diphosphoinositides et 12,11 µg de P de triphosphoinositides contre respectivement 18,15 µg de P de diphosphoinositides et 18,12 µg de P de triphosphoinositides en traitant directement le résidu d'évaporation au chloroforme-méthanol-HCl 12N (200:100:0,1): de même, à partir de l'extrait B on obtient 17,42 µg de P de diphosphoinositides et 21,44 µg de P de triphosphoinositides contre respectivement 23,34 µg de P de diphosphoinositides et 31,28 µg de P de triphosphoinositides. La quantité totale de polyphosphoinositides obtenue est toujours supérieure après extraction du tissu par le mélange chloroforme-méthanol 2:1. Il se confirme donc qu'il existe une fraction de polyphosphoinositides fortement liée aux protéolipides. Quantitativement elle représente la différence entre les teneurs en phosphoinositides des solutions III et I ainsi que IV et II. Par ailleurs,

cette fraction devient insoluble dans le mélange chloroforme-méthanol-HCl 12 N (200:100:0,1) après évaporation et traitement du résidu sec par le chloroforme.

b) Inositides extraits par le mélange chloroforme-méthanol-HCl.

Il résulte de nos expériences que les extraits lipidiques C et D obtenus par le mélange chloroforme-méthanol-HCl 12 N (200:100:0,1) après action des solvants neutres et lavage dans les conditions décrites dans les schémas I et II, renferment également des polyphosphoinositides, mais les quantités de l'extrait C obtenu après extraction préalable du tissu par le mélange chloroforme-méthanol 1:1 sont supérieures à celles de l'extrait D obtenu par traitement préalable du tissu par le mélange chloroforme-méthanol 2:1 (Tableau IV). En effet, les teneurs de P en diphosphoinositides et triphosphoinositides sont respctivement de 0,62 µg et de 1,36 µg par gramme de tissu frais dans la solution D, contre respectivement 6,12 µg et 11,42 µg dans la solution C. Notons que la somme du P des diphosphoinositides et du P des triphosphoinositides des solutions III et C et IV et D sont comparables. On trouve respectivement pour les diphosphoinositides 24,27 µg de P et 23,96 µg de P par gramme de tissu frais et pour les triphosphoinositides 29,54 µg de P et 32,64 µg de P par gramme de tissu frais.

Il s'ensuit donc qu'en traitant le résidu d'extraction après action des solvants neutres par le mélange chloroforme-méthanol-HCl 12 N (200:100:1), on finit par extraire

l'ensemble des polyphosphoinositides non obtenus par action des solvants neutres.

c) Discussion.

La quantité de polyphosphoinositides extraite par les solvants neutres dépend de la composition du mélange solvant ainsi que des conditions expérimentales. L'utilisation du solvant chloroforme-méthanol 2:1 et le fait de procéder à deux extractions à température ordinaire, suivie d'une extraction à température de 40°, permettent de récupérer 96 p. 100 de la quantité totale des polyphosphoinositides présents dans le tissu nerveux sans faire appel à l'emploi d'acide. La fraction de polyphosphoinositides non extraits par les solvants neutres est ensuite facilement solubilisée par le traitement du résidu d'extraction à l'aide du mélange chloroforme-méthanol-HCl (200:100:1). Cette double extraction permet de recueillir la totalité des polyphosphoinositides initialement présents dans le tissu cérébral.

Il est généralement admis que la majeure partie, sinon la totalité des polyphosphoinositides, existe dans le cerveau sous forme de "complexe protéique", "protéolipides ou phosphatidopeptides", les premiers se dissolvant dans les mélanges chloroforme-méthanol neutres, les seconds uniquement dans le chloroforme-méthanol-HCl. Il résulte de nos données expérimentales que la quantité de polyphosphoinositides extraite par le chloroforme-méthanol-HCl varie en fonction de la composition du solvant neutre et des conditions expérimentales préalables. En effet, suivant le solvant neutre utili-

sé, on extrait encore par le chloroforme-méthanol-HCl 25,2 p. 100 de diphosphoinositides et 38,7 p. 100 de triphosphoinositides ou seulement 2,59 p. 100 de diphosphoinositides et 4,16 p. 100 de triphosphoinositides. Signalons que REBEL (178), étudiant l'extraction des protéolipides bactériens, arrive à des conclusions analogues.

Il semble par ailleurs, que la liaison "polyphosphoinositide-protéine" devienne plus solide après dénaturation de ces derniers. En effet, il ressort de nos expériences que la redissolution des polyphosphoinositides après évaporation d'un extrait lipidique à sec, devient plus difficile si l'on traite au préalable ces résidus par le chloroforme. La quantité totale de polyphosphoinositides obtenue en traitant le résidu d'évaporation de l'extrait lipidique directement par le mélange chloroforme-méthanol-HCl 12 N (200:100:0,1) est toujours supérieure à ce que l'on obtient en faisant agir successivement le chloroforme puis le mélange chloroforme-méthanol-HCl 12 N (200:100:0,1). Le procédé que nous proposons (redissolution des extraits secs directement par le mélange chloroforme-méthanol-HCl 12 N (200:100:0,1) paraît donc plus efficace pour la libération des polyphosphoinositides des complexes dans lesquels ils se trouvent engagés.

Sur le plan pratique d'une étude quantitative de la répartition des polyphosphoinositides dans le cerveau, nous extrayons le tissu congelé dans l'azote liquide et lyophilisé par le mélange chloroforme-méthanol 2:1 deux fois à tem-

rature ordinaire et une fois à 40°. Avant le dosage des polyphosphoinositides, l'extrait neutre est lavé par 1/5è d'eau, puis évaporé à sec et le résidu repris par le mélange chloroforme-méthanol-HCl 12 N (200:100:0,1). L'extrait acide est lavé successivement par l'HCl N, puis par le chloroforme-méthanol-$CaCl_2$ 0,05 M (3:48:47), évaporé à sec et repris par le mélange chloroforme-méthanol-HCl 12 N (200:100:0,1). Le dosage des diphosphoinositides et des triphosphoinositides est ensuite effectué par détermination du P après fractionnement de ces composés par chromatographie sur papier formolé (105).

C) Mise au point d'une méthode d'isolement de fractions enrichies en neurones et en cellules gliales.

Du point de vue morphologique deux types de cellules prédominent dans le cerveau: les neurones et les cellules gliales. Bien que l'on rencontre de grandes différences au sein de chaque groupe de ces cellules, il existe à la fois sur le plan morphologique et fonctionnel un dénominateur commun, d'une part entre les neurones et d'autre part entre les cellules gliales.

Des méthodes de séparation de neurones et de cellules gliales ont été décrites par CHU (35), HYDEN et PIGON (109), LOWRY (140) et ROOTS et JOHNSTON (183). Mais ces techniques sont longues et fastidieuses et ne permettent d'obtenir qu'un nombre très limité de cellules.

Récemment, SATAKE et ABE (193) ainsi que ROSE (185, 186) ont mis au point des techniques de séparation de neurones et de cellules gliales par ultracentrifugation différentielle permettant d'obtenir des quantités appréciables de matériel. Mais les premiers auteurs ne récoltent que des neurones et la technique de ROSE est difficillement reproductible et les cellules obtenues présentent de grandes altérations. Dans le but de récolter des neurones et des cellules gliales en quantités suffisantes et ayant subi un minimum d'altérations, nous avons élaboré une technique d'isolement de ces deux types de cellules.

a) Description de la technique.

Nos essais portent sur la matière grise du cortex cérébral de Rat. Après décapitation des animaux, les cerveaux sont prélevés et immédiatement transférés dans une solution de chlorure de sodium à 9 p. 1000. Toutes les opérations ultérieures sont effectuées à une température comprise entre 0 et 4° dans une vitrine réfrigérée (144). Après avoir été débarrassé de la matière blanche et des méninges, le cortex est coupé en petits fragments, puis fixé dans le mélange glycérol-acétone-eau (1:1:1) préconisé par SATAKE et ABE (193). On utilise 4 ml de mélange par cortex et la durée de fixation est de 30 minutes. La suspension est ensuite centrifugée et le culot est broyé doucement à travers un tamis en nylon dans un mélange glycérol-saccharose 0,25 M (3:1) 3 ml par cortex. La suite des opérations est résumée dans les schémas C et D.

SCHEMA C

Substance grise du cortex
coupée en petits fragments
traité au mélange glycérol-acétone-eau (1:1:1)
4 ml/cortex 30'

↓

Centrifuger 10' 2500 t/m

culot — Surnageant éliminé

↓

Broyer à travers tamis en nylon
82 µ dans mélange glycérol-saccharose 0,25 M (3:1) 3 ml/cortex

↓

Diluer avec NaCl 9 ‰
2 à 3 vol.

↓

Filtrer à travers tamis métallique
58 µ

↓

Centrifuger 15'
2500 t/m

culot — Surnageant éliminé

↓

Homogénéiser
dans saccharose 0,25 M
10 ml/3 cortex

↓

Suspension cellulaire I

↓

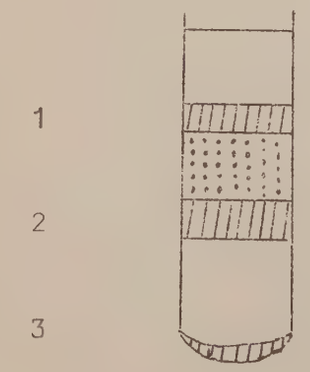
Centrifuger sur gradient
saccharose 1,75 M - 1,00 M
30' 20.000 t/m

Interphase 0,25 M - 1,00 M — Interphase 1,00 M - 1,75 M — Culot

↓ ↓ ↓

Débris cellulaires — Agrégats — Fraction enrichie en neurones

1 — 2 — 3



SCHEMA D

Interphase 1,00 M - 1,75 M

Agrégats

Filtrer sur tamis métallique 58 µ
dans glycérol-saccharose 0,25 M (3:1)
4 ml/3 cortex

Diluer avec NaCl 9 ‰
2 à 3 vol.

Centrifuger 15' 2500 t/m

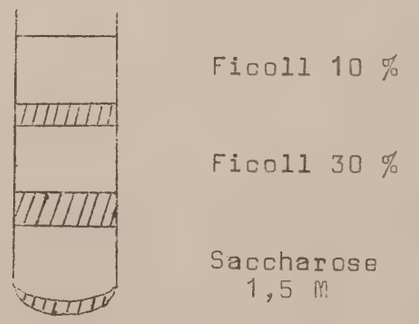
Culot — Surnageant éliminé

Homogénéiser dans
ficoll 10 %
10 ml/3 cortex

Suspension cellulaire II

Centrifuger sur gradient
saccharose 1,50 M
Ficoll 30 %
90' 25.000 t/m

Interphase 10% - 30% ficoll	Interphase 30% ficoll-saccharose 1,50 M	Culot
Débris cellulaires	Fraction enrichie en cellules gliales	Neurones + Gliales
1	2	3



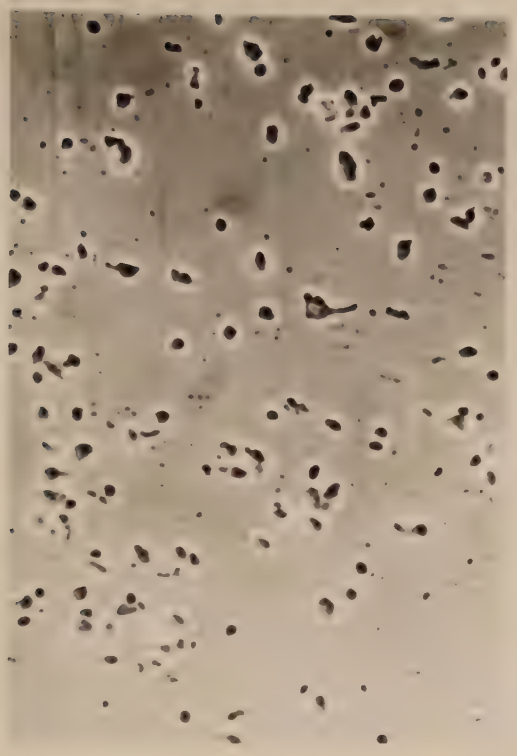
b) Observations microscopiques et numération cellulaire.

L'observation microscopique en contraste de phase de la fraction enrichie en neurones, nous montre à faible grossissement (Fig. VI) des plages de péricaryons neuronaux très homogènes. A fort grossissement on note que la majeure partie de ces cellules sont intactes et présentent encore des fragments d'expansion plus ou moins nombreux (Fig. VI). Enfin, la structure morphologique de ces cellules est typique de celle d'un neurone (noyau à nucléole unique). A partir des cortex d'un cerveau, on peut récolter de 1 à 3 x 10^6 cellules, ce qui représente de 6 à 20 p. 100 des neurones totaux du cortex (35). Le taux de neurones de cette fraction évalué par comptage différentiel en nous basant sur la structure du noyau est de l'ordre de 80 p. 100 (Tableau V).

Dans le cas de la fraction enrichie en cellules gliales, la structure morphologique de ces cellules est typique (Fig. VII). Ici encore, les cellules portent de nombreuses expansions (Fig. VII). Le nombre de cellules isolées varie de 4 à 8 x 10^6 cellules par cortex. Le contrôle de la pureté de cette fraction évaluée comme précédemment nous révèle qu'en moyenne elle contient 90 p. 100 de cellules gliales (Tableau VI).

c) Activité de l'anhydrase carbonique dans les fractions cellulaires.

En 1962, GIACOBINI (87) détermina l'activité de l'anhydrase carbonique dans les neurones et les cellules gliales isolés par microdissection des noyaux de Deiters et



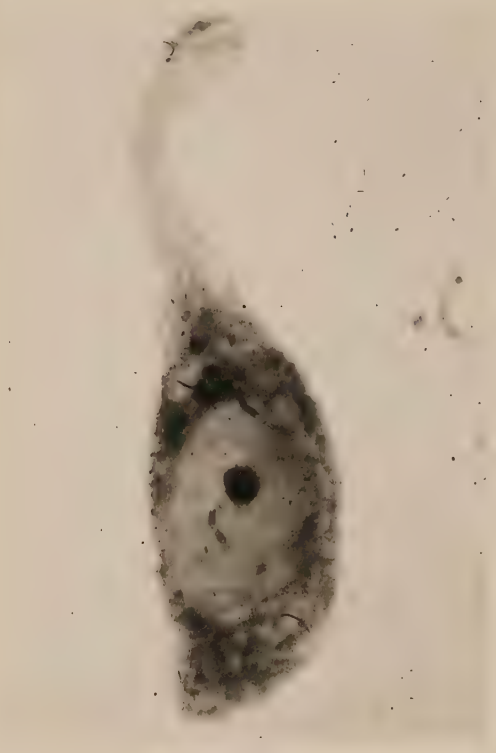


FIGURE VI. - Neurones isolés du cortex cérébral de Rat.

a), b), c): photographies prises au microscope en contraste de phase.

d) après coloration au bleu de méthylène.

Grossissement: a) x 100; b), c) et d) x 1000

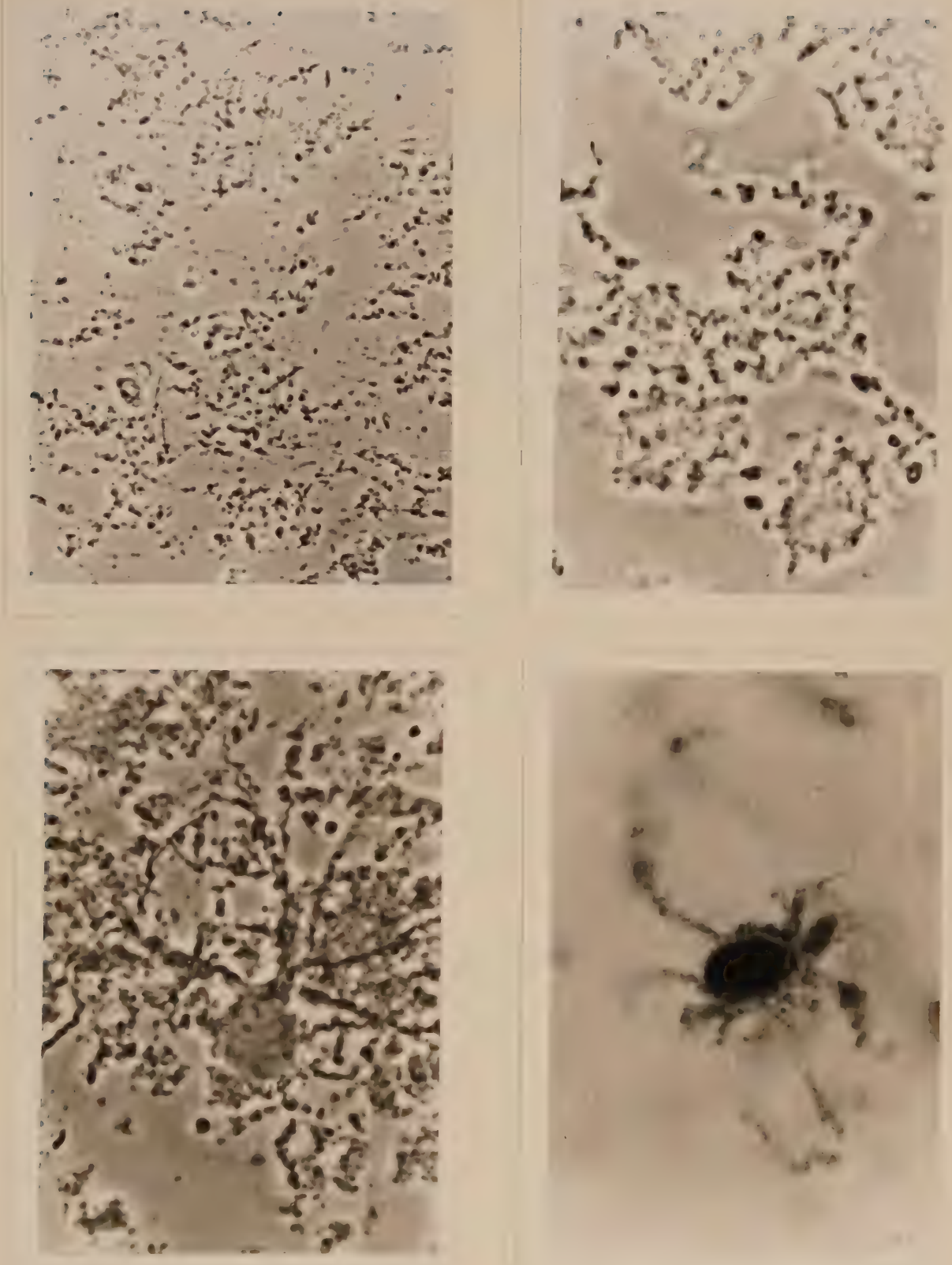


FIGURE VII. - Cellules gliales isolées du cortex cérébral de Rat.
a), b), c): photographies prises en contraste de phase
d): après coloration au bleu de méthylène

Grossissement: a) x 100; b), c), d) x 1000

TABLEAU V

REPARTITION DES CELLULES DANS LA FRACTION ENRICHIE EN NEURONES ISOLEE DU CORTEX CEREBRAL DE RAT

EXP.	Nombre de cellules par cortex	p.100 de neurones présents dans la fraction	p.100 de gliales présentes dans la fraction
I	$2,9 \times 10^6$	77	23
II	$2,2 \times 10^6$	83	17
III	$3,1 \times 10^6$	82	18
IV	$2,4 \times 10^6$	84	16
MOY.	$2,6 \times 10^6$	81	19

TABLEAU VI

REPARTITION DES CELLULES DANS LA FRACTION ENRICHIE EN CELLULES GLIALES ISOLEE DU CORTEX CEREBRAL DE RAT

EXP.	Nombre de cellules par cortex	p.100 de neurones présents dans la fraction	p.100 de gliales présentes dans la fraction
I	$6,7 \times 10^6$	10	90
II	$5,9 \times 10^6$	10	90
III	$7,4 \times 10^6$	13	87
IV	$4,3 \times 10^6$	10	90
V	$8,8 \times 10^6$	7	93
MOY.	$6,6 \times 10^6$	10	90

calcula que l'activité enzymatique des cellules gliales est de 100 à 120 fois supérieure à celle des neurones. L'anhydrase carbonique représente donc un test chimique des cellules gliales qui permet d'obtenir des informations sur la contamination en cellules gliales de la fraction enrichie en neurones. Les résultats de la détermination de l'activité de l'anhydrase carbonique dans les fractions enrichies en cellules gliales et en neurones sont rapportés dans le tableau VII. On note que l'activité enzymatique de la fraction enrichie en cellules gliales est de l'ordre de 5 unités enzymatiques par mg d'azote total, alors que celle de la fraction enrichie en neurones est nulle. Ces données, bien que moins rigoureuses que le comptage différentiel, nous apportent donc une preuve supplémentaire, indiquant que la contamination de la fraction enrichie en neurones par des cellules gliales est très faible.

TABLEAU VII

ACTIVITE DE L'ANHYDRASE CARBONIQUE DANS LES FRACTIONS ENRICHIES EN NEURONES ET EN CELLULES GLIALES. ISOLEES DU CORTEX CEREBRAL DE RAT

Résultats en unités enzymatiques par mg N total.

Fractions dnrichies en cellules gliales	Fractions enrichies en Neurones
4,28	0
5,27	0

CHAPITRE II

Rythme de l'accroissement des phosphatides du système nerveux central au cours de son développement.

On possède peu de documents sur la régulation de la maturation cérébrale. Il ressort d'observations morphologiques et histologiques que le développement du cerveau comporte quatre étapes (9, 158).

La première étape est caractérisée par l'intensité de la division cellulaire. Cette période se situe chez le Rat au stade précoce du développement intra-utérin, et en raison de nombreuses difficultés techniques, nou ne l'avons pas étudiée.

Au cours de la deuxième étape qui, chez le Rat, s'étend du 1er au 10è jour de la vie post-natale, on assiste à l'accroissement de la masse cellulaire et au développement des axones et dendrites. Parallèlement, les divisions cellulaires se poursuivent.

La troisième étape se différencie des deux premières par l'apparition des phénomènes de la myélinisation et l'arrêt de la prolifération cellulaire. La période de myélinisation intense se situe entre le 10è et le 30è jour de la vie post-natale.

Enfin, la quatrième étape débute aux environs du 30è jour de la vie post-natale et s'étend jusqu'à la maturation complète du cerveau. Durant cette période, la myélinisation

se poursuit ainsi que l'augmentation de la masse cellulaire, mais cette dernière se fait à un rythme plus lent.

Les premières investigations sur l'évolution chimique du système nerveux central au cours de son développement ont été menées par KOCH (122) et son équipe au début de ce siècle et plus tard par Mc ARTHUR et DOISY (157). Cependant, les résultats de l'ensemble de ces travaux revus par PAGE (173) sont sujets à de sérieuses critiques dues aux techniques utilisées. C'est surtout depuis 1949 que l'étude des phospholipides du cerveau au cours de la croissance a fait l'objet de recherches plus approfondies (18, 23, 79, 205). Mais ces études sont encore restées incomplètes. Ainsi, BIETH (18), JOHNSTON et coll. (114), MANUKYAN et coll. (146) qui étudient les divers lipides du cerveau, n'ont pas séparé les phosphatidyl-dérivés des plasmalogènes et des éther-dérivés. D'autres auteurs, tels que EDGAR (61) et ANSELL et SPANNER (7) ne rapportent que des études sur les sphingomyélines sans se préoccuper des autres phosphatides. Enfin, KOREY et ORCHEN (124), STAMMLER et DEBUCH (207), MINDER et ABELIN (165) se sont intéressés exclusivement aux plasmalogènes totaux, sans déterminer la part revenant aux divers types d'acétalphosphatides. Par ailleurs, ces recherches fragmentaires ont porté pour certains constituants sur le cerveau de Rat (146, 129, 165, 205), pour d'autres sur ces cerveaux de Souris (79, 213), de Lapin (41, 62, 64) et de l'Homme (15, 39, 144, 207). Il est

de ce fait quasiment impossible d'établir une correlation rigoureuse entre le rythme d'accumulation des divers phosphatides et le développement du cerveau pour une même espèce.

Le mode d'expression des résultats ne permet pas toujours de comparer les différents travaux et de se faire une idée des variations de la composition lipidique du cerveau en fonction de l'âge (213). De nombreux auteurs rapportent les résultats au poids frais ou au poids sec de l'organe. Cependant la composition chimique du cerveau varie par suite de l'augmentation de ses constituants et de la diminution de sa teneur en eau (18, 79). Ainsi, une augmentation de la teneur lipidique peut être masquée par un accroissement plus intense d'autres composés. Il nous a semblé plus judicieux d'évaluer les quantités totales des phospholipides du cerveau aux diverses étapes de sa croissance, ce qui permet d'établir le rythme d'accroissement de ces composés au cours de sa maturation. Nous avons également calculé pour chaque âge la quantité de chaque phosphatide par rapport à celle de l'animal adulte. En posant les valeurs de l'adulte égales à 100, il est aisé dans ces conditions, d'analyser et de comparer les pentes qui traduisent l'accumulation de chaque constituant dans un intervalle de temps donné.

A) Développement biochimique du cerveau de Rat.

a) Introduction.

Nous avons suivi le développement du cerveau de Rat depuis la naissance jusqu'à l'âge de 6 mois. Durant cette période le poids frais du cerveau augmente dans les propor-

tions de 1 à 6 (Tableau VIII). La teneur relative en eau diminue progressivement en passant de 98 à 77,5 p. 100. Comme corrolaire on constate une augmentation notable du poids sec qui passe de 32,9 mg à 1 jour à 401 mg chez l'adulte, donc de 1 à 12 (Tableau VIII). Ceci reflète un accroissement considérable des lipides et des protéines. En fait, si on considère ces constituants individuellement on note un accroissement de 1 à 25 pour les lipides, de 1 à 12 pour les protéines.

b) Acide désoxyribonucléique.

L'augmentation en quantités absolues de l'ADN permet de se faire une idée de la prolifération cellulaire. Contrairement à ce qui avait été déduit d'études histologiques et morphologiques (9, 158), on constate que la division cellulaire est loin d'être achevée à la naissance (Tableau VIII). L'augmentation des quantités absolues de P. ADN étant de l'ordre de 1 à 3 durant la période post-natale, il en résulte que 34 p. 100 seulement des cellules sont présentes à la naissance. L'examen des variations du rythme d'accumulation du P. ADN durant la période considérée (Fig. VIII) montre que la néosynthèse est très intense et régulière jusqu'au 15è jour de la vie post-natale et atteint son maximum aux environs du 16è jour, phénomène déjà observé par BIETH (18). A partir de cette époque il n'y a donc plus de néoformation cellulaire. Ainsi les variations de la teneur des constituants du cerveau au-delà du 16è jour sont à mettre exclusivement sur le compte de l'accroissement de la masse cellulaire et de la myélinisa-

TABLEAU VIII

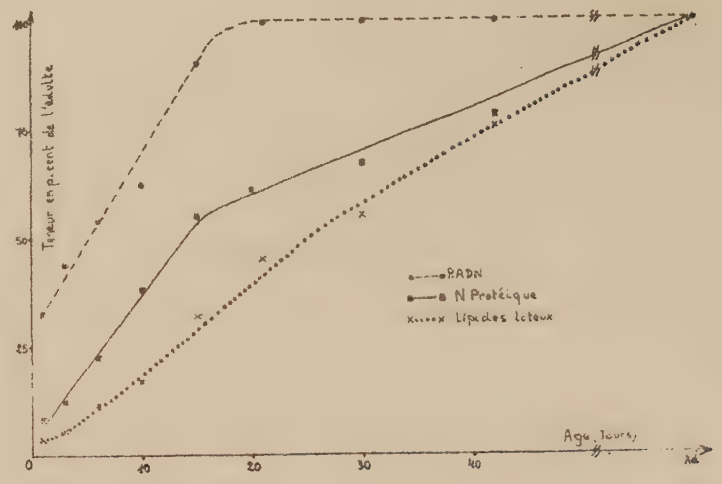
CERVEAU DE RAT

A/ Poids frais, poids sec, ADN et N protéique par cerveau au cours de la croissance.

Age	1 j.	3 j.	6 j.	10 j.	15 j.	21 j.	30 j.	42 j.	Adultes
Poids frais g	0,294 ±0,003	0,337 ±0,015	0,570 ±0,045	0,800 ±0,014	1,07 ±0,037	1,24 ±0,017	1,35 ±0,022	1,54 ±0,060	1,77 ±0,077
Poids sec mg	32,9 ± 1,16	51,5 ± 9,35	83,2 ± 2,73	128 ± 12,65	189 ± 5,43	238 ± 8,65	291 ± 11,5	322 ± 17,5	401 ± 8,31
P ADN µmoles	1,32 ±0,10	2,08 ±0,15	2,57 ± 0,11	2,90 ±0,53	4,18 ± 0,24	4,66 ±0,43	4,90 ± 0,41	5,05 ± 0,20	4,70 ±0,37
N protéique mg	2,30 ±0,44	3,43 ±1,00	6,09 ± 1,07	10,4 ± 0,53	14,9 ± 0,16	16,7 ±0,61	18,2 ± 1,31	21,1 ± 0,55	27,2 ±0,56

B/ Taux d'ADN et de N protéique en p.cent de la teneur de l'adulte dans le cerveau au cours de la croissance

Age	1 j.	3 j.	6 j.	10 j.	15 j.	21 j.	30 j.	42 j.	Adultes
P ADN	33,0	44,0	54,0	62,0	89,0	100	100	100	100
N protéique	8,5	12,6	22,4	38,2	55,0	61,5	67,0	78,0	100



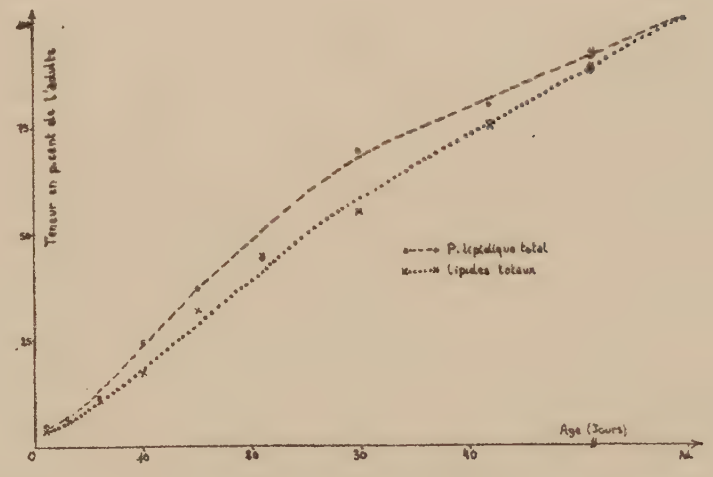


FIGURE VIII. - Evolution du taux du DNA, des protéines, des lipides et des phospholipides au cours de la croissance post-natale. Résultats en p.cent de la teneur de l'adulte.

tion. Notons qu'aux environs du 15è jour on observe également des modifications importantes de la consommation en oxygène (19) et de la répartition des dérivés phosphorés acido-solubles (143) et du comportement des animaux.

c) Protéines.

Le rythme de l'augmentation des protéines passant de 1 à 12 est nettement différent de celui de l'ADN (Tableau VIII) et reflète celui du poids sec. La figure VIII montre que l'accroissement des protéines se fait en deux étapes: une première qui s'étend jusqu'au 15è jour de la vie post-natale où la néosynthèse se révèle être très intense et une deuxième qui débute au 15è jour où l'on assiste à une diminution relative de celle-ci. Ce ralentissement de la synthèse protéique est probablement lié à l'arrêt de la division cellulaire et par suite les protéines synthétisées à partir de cette date correspondent essentiellement à la croissance des expansions cellulaires et aux phénomènes de la myélinisation.

d) Lipides.

L'augmentation de la teneur en lipides dans les proportions de 1 à 25 (Tableau IX) durant la période envisagée, se révèle être bien plus intense que celle des protéines qui n'accusent qu'une augmentation de 1 à 12. Le rythme de la néosynthèse de ces composés (Fig. VIII) se différencie de celui des protéines par sa régularité tout au long du développement cérébral. L'absence du ralentissement de la synthè-

TABLEAU IX

CERVEAU DE RAT

A/ Quantités absolues de lipides et de phospholipides par cerveau au cours de la croissance.

Age	1 j.	3 j.	6 j.	10 j.	15 j.	21 j.	30 j.	42 j.	Adultes
Lipides totaux mg	6,84 ±0,45	10,6 ± 0,59	19,6 ± 0,90	28,9 ± 0,17	54,5 ± 1,92	76,6 ± 3,28	93,7 ± 2,55	128 ± 4,54	170 ±9,40
P lipidique total µmoles	6,38 ±0,26	8,12 ±0,29	13,8 ± 0,45	31,6 ± 1,84	47,2 ± 1,49	56,1 ± 2,25	88,3 ± 2,88	102 ± 2,88	127 ±3,87

B/ Taux de lipides et de phospholipides en p.cent de la teneur de l'adulte dans le cerveau au cours de la croissance.

Age	1 j.	3 j.	6 j.	10 j.	15 j.	21 j.	30 j.	42 j.	Adultes
Lipides totaux	4,10	6,20	11,5	17,0	32,0	45,0	55,0	75,0	100
P lipidique total	5,00	6,40	10,8	24,8	37,0	44,0	69,2	79,7	100

se des lipides aux environs du 15è jour est donc due essentiellement à la myélinisation qui prend le relais de la synthèse des formations membranaires de la cellule. Ainsi, contrairement à ce qui est le cas des protéines, un accroissement important des lipides se manifeste au-delà de la période d'arrêt de la prolifération cellulaire.

e) Phosphatides.

Les quantités absolues de P lipidique passent de 6,38 µmoles à 1 jour à 127 µmoles chez l'adulte, c'est-à-dire que les phospholipides augmentent dans les proportions de 1 à 20 (Tableau IX). Le rythme d'accumulation de ces composés diffère sensiblement de celui de la totalité des lipides (Fig. VIII). La néosynthèse des phosphatides régulière entre la naissance et le 30è jour, se révèle être supérieure à celle de l'ensemble des lipides totaux. En effet, 69 p. 100 de l'ensemble des phosphatides de l'adulte sont déjà présents au 30è jour, alors qu'on trouve seulement 55 p. 100 des lipides totaux. Il existe donc au niveau du tissu nerveux des lipides dont le rythme d'accumulation au cours du développement cérébral avant le 30è jour est plus lent que celui des phospholipides et s'avère plus intense à partir de cette date. Parmi ces composés citons les cérébrosides et le cholestérol (39, 41, 79). Il ressort donc de ces données que le rythme de synthèse des divers composés lipidiques diffère au cours de la croissance du cerveau. Ceci apparaît d'une façon particulièrement évidente quand on examine individuellement les divers phosphatides.

- Phosphatidyl-cholines, phosphatidyl-éthanolamines, phosphatidyl-sérines.

Ces constituants sont présents à un taux relativement importants dans le cerveau du jeune animal. La teneur en phosphatidyl-cholines est toujours la plus élevée, tandis que celle en phosphatidyl-sérines se révèle être la plus faible, comme l'ont déjà signalé DAWSON (52) et DAWSON, HEMINGTON et DAVENPORT (53) dans le cas du cerveau adulte. Il ressort de nos expériences qu'au cours de la période de croissance envisagée, les phosphatidyl-cholines passent de 3,08 µmoles à 41,65 µmoles, ceux à éthanolamines de 0,85 µmoles à 20,77 µmoles et ceux à sérines de 0,56 µmoles à 12,90 µmoles, c'est-à-dire qu'ils augmentent respectivement dans les proportions de 1 à 14, de 1 à 24 et de 1 à 23 (Tableau X). En étudiant l'accumulation de ces composés en fonction des trois étapes histologiques du développement post-natal du cerveau (Fig. IX), on constate que leur synthèse est très intense et sensiblement parallèle entre le premier et le 10è jour. A cette date la teneur relative des phosphatidyl-cholines par rapport à la valeur de l'adulte est déjà de 34 p. 100, celle des phosphatidyl-éthanolamines de 35 p. 100 et celle des phosphatidyl-sérines de 20 p. 100. La synthèse se poursuit au même rythme jusqu'au 31è jour, c'est-à-dire durant la période de myélinisation intense. A cette époque environ 75 p. 100 de ces trois phospholipides sont présents dans le cerveau. Enfin, au cours de la dernière étape, l'accrois-

TABLEAU X

CERVEAU DE RAT

A/ Quantités absolues de phosphatidyl-cholines, phosphatidyl-éthanolamines et phosphatidyl-sérines par cerveau au cours de la croissance.

Age	1 j.	3 j.	6 j.	10 j.	15 j.	21 j.	30 j.	42 j.	Adultes
Phosphatidyl-cholines µmoles	3,08 ±0,356	4,08 ±0,350	6,33 ±1,12	14,02 ±1,61	20,95 ± 1,37	24,01 ± 4,02	33,13 ± 1,43	35,97 ± 2,09	41,65 ± 4,88
Phosphatidyl-éthanolamines µmoles	0,85 ±0,20	1,19 ±0,69	2,67 ±0,32	7,29 ±0,23	8,62 ± 1,18	10,18 ± 1,99	14,92 ± 1,28	18,30 ± 1,81	20,77 ± 3,15
Phosphatidyl-sérines µmoles	0,59 ±0,08	0,89 ±0,03	1,49 ±0,04	2,65 ±0,11	4,17 ± 0,46	6,18 ± 0,19	9,81 ± 0,70	11,80 ± 0,82	12,90 ± 0,68

B/ Taux de phosphatidyl-cholines, phosphatidyl-éthanolamines, phosphatidyl-sérines en p.cent de la teneur de l'adulte dans le cerveau au cours de la croissance.

Age	1 j.	3 j.	6 j.	10 j.	15 j.	21 j.	30 j.	42 j.	Adultes
Phosphatidyl-cholines	7,40	9,80	15,2	33,7	50,3	57,7	79,6	86,3	100
Phosphatidyl-éthanolamines	4,10	5,72	12,9	35,2	40,0	49,3	72,0	88,0	100
Phosphatidyl-sérines	4,34	6,90	11,5	20,5	32,4	48,0	76,2	91,4	100

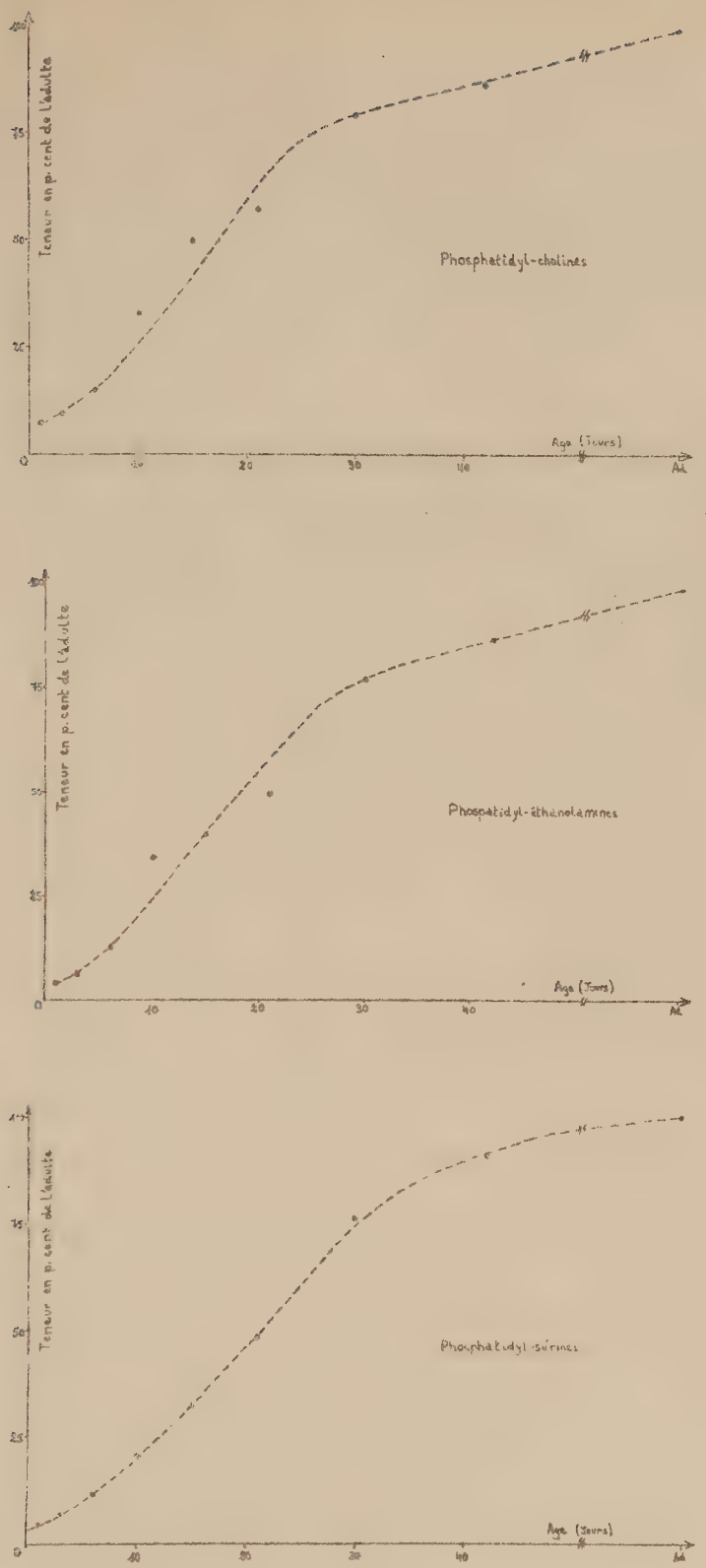


FIGURE IX. - Cerveau de Rat. Evolution du taux des phosphatidyl-cholines, phosphatidyl-éthanolamines et phosphatidyl-sérines au cours de la croissance post-natale. Résultats en p.cent de la teneur de l'adulte.

sement de ces composés subit un ralentissement très net. Il apparaît donc que la néosynthèse de ces composés est très intense durant les deux premières étapes du développement cérébral, c'est-à-dire avant et pendant la première période de la myélinisation.

- Plasmalogènes.

Le cerveau jeune renferme déjà les plasmalogènes correspondant aux phosphatidyl-dérivés. Tout au long du développement les plasmalogènes à éthanolamine prédominent nettement, comme l'ont déjà signalés dans le cas du cerveau adulte KLENK et coll. (120, 121), ANSELL et coll.(2,3) et WEBSTER (224). L'accroissement relatif des plasmalogènes à choline de 1 à 35, de ceux à éthanolamine de 1 à 42 et de ceux à sérines de 1 à 27 est nettement supérieur à celui des phosphatidyl - dérivés correspondants durant la période de croissance envisagée (Tableau XI). Cette augmentation plus intense des acétalphosphatides traduit un rythme de la néosynthèse différent de celui des phosphatidyl-dérivés. En rapportant les quantités absolues de plasmalogènes présents à chaque âge à celles de l'adulte, on constate que leur néosynthèse est très faible avant le 10è jour de la vie post-natale, c'est-à-dire durant la première étape histologique (Fig. X). En effet, au 10è jour on ne trouve respectivement que 14 p. 100, 15 p. 100 et 15 p. 100 de plasmalogènes à choline, éthanolamine et sérine, taux nettement inférieur à celui des phosphatidyl-dérivés correspondants qui se situe autour de 30 p.100.Au cours de la deuxième étape le rythme de la synthèse de ces composés augmente brusquement et

TABLEAU XI

CERVEAU DE RAT

A/ Quantités absolues de plasmalogènes par cerveau au cours de la croissance.

Age	1 j.	3 j.	6 j.	10 j.	15 j.	21 j.	30 j.	42 j.	Adultes
Plasmalogènes à choline µmoles	0,142 ±0,026	0,190 ±0,024	0,330 ±0,017	0,680 ±0,26	0,900 ±0,15	1,520 ±0,16	2,800 ±0,74	3,100 ±0,82	4,900 ±0,21
Plasmalogènes à éthanolamine µmoles	0,517 ±0,168	0,572 ±0,025	0,878 ±0,10	3,120 ±0,69	3,920 ±0,28	5,750 ±0,53	9,510 ±0,26	18,20 ±0,92	21,90 ±1,48
Plasmalogènes à sérine µmoles	0,096 ±0,005	0,135 ±0,015	0,203 ±0,029	0,369 ±0,018	0,473 ±0,048	0,920 ±0,136	1,202 ±0,132	1,970 ±0,311	2,510 ±0,302

B/ Taux de plasmalogène en P.cent de la teneur de l'adulte dans le cerveau au cours de la croissance.

Age	1 j.	3 j.	6 j.	10 j.	15 j.	21 j.	30 j.	42 j.	Adultes
Plasmalogènes à choline	2,90	3,88	6,74	13,9	18,4	31,0	57,1	63,2	100
Plasmalogènes à éthanolamine	2,36	2,61	4,01	14,9	18,7	27,5	45,6	83,0	100
Plasmalogènes à sérine	3,82	5,48	8,10	14,7	18,8	36,7	48,0	78,5	100

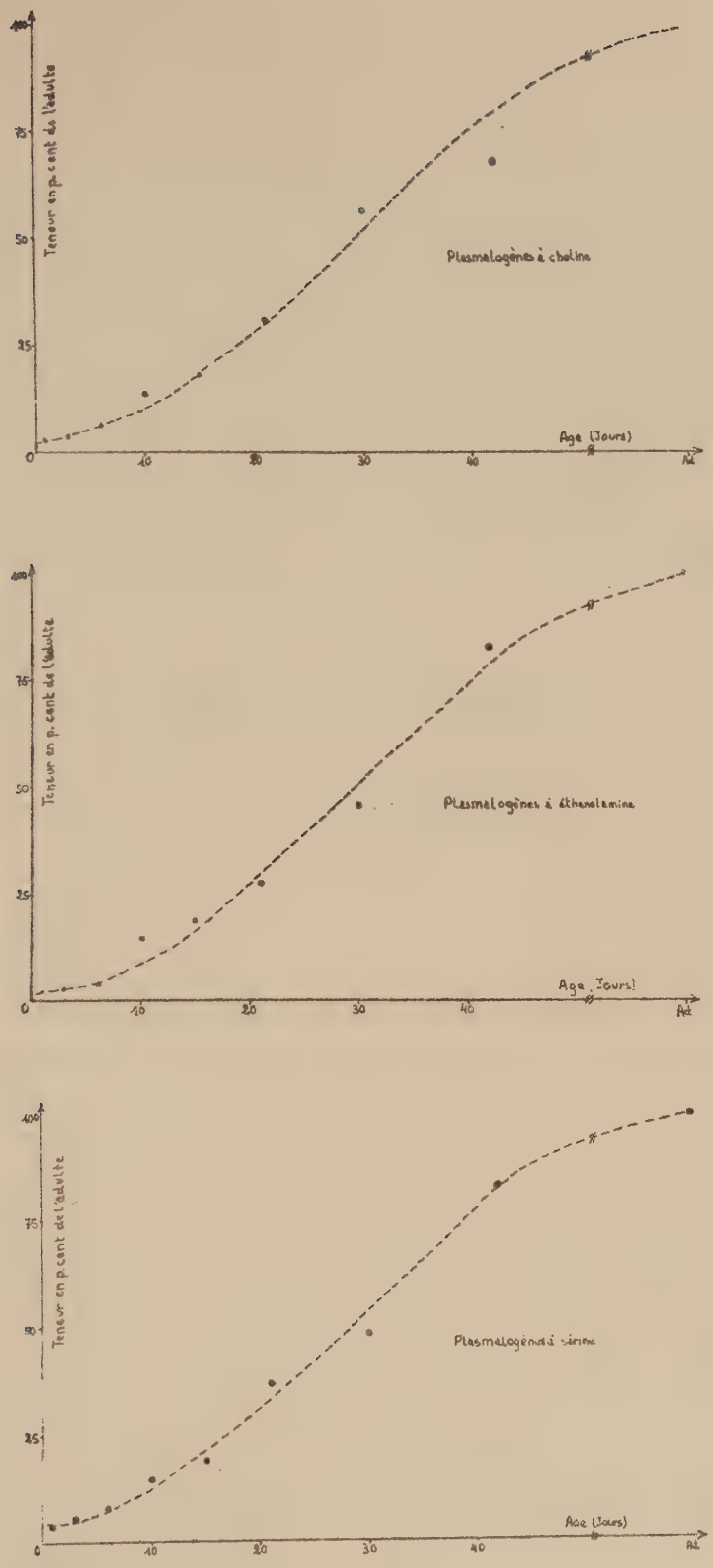


FIGURE X. - Cerveau de Rat. - Evolution du taux des divers plasmalogènes au cours de la croissance post-natale. Résultats en p.cent de la teneur de l'adulte.

devient sensiblement parallèle à celui des phosphatidyl-dérivés. Cette accumulation intense se poursuit ensuite régulièrement durant la troisième étape du 30è au 42è jour, et ce n'est qu'au-delà de cette date qu'on observe un ralentissement de leur synthèse. Il résulte donc de ces données que la synthèse la plus intense des plasmalogènes à choline, éthanolamine et sérine, contrairement aux phosphatidyl-dérivés, s'effectue au cours de la deuxième et de la troisième étape du développement cérébral, c'est-à-dire qu'elle est parallèle à la myélinisation.

- Ether-phosphatides à éthanolamine.

Les éther-phosphatides n'ont été décrits que récemment dans le tissu nerveux par SVENNERHOLM et THORIN (208) et ANSELL et SPANNER (8). Il ressort des travaux de HORROCKS et ANSELL (106, 107) que ces composés se trouvent exclusivement sous forme de phosphatides à éthanolamine. Nous avons observé qu'au cours du développement les quantités absolues de ces composés passent de 0,027 µmoles à 1,20 µmoles, c'est-à-dire qu'ils subissent une augmentation de 1 à 44, du même ordre de grandeur que celle des plasmalogènes correspondants (Tableau XII). De l'étude des variations du rythme d'accumulation de ces composés (Fig. XII), il résulte que leur néosynthèse, faible avant le 10è jour, se révèle être très intense pendant les périodes de la myélinisation, comme pour les acétalphosphatides.

- Cardiolipides.

La présence des cardiolipides n'a été démontrée jusqu'ici que dans le cerveau adulte par DAWSON (52), WAGNER et coll. (223), HÖLZL (100) et COURTADE et coll. (37). Il ressort

TABLEAU XII

CERVEAU DE RAT

A/ Quantités absolues d'éther-phosphatides à éthanolamine, de cardiolipides et de sphingomyélines par cerveau au cours de la croissance.

Age	1 j.	3 j.	6 j.	10 j.	15 j.	21 j.	30 j.	42 j.	Adultes
Ether-phosphatides à éthanolamine µmoles	0,027 ±0,005	0,036 ±0,001	0,065 ±0,008	0,137 ±0,021	0,170 ±0,011	0,400 ±0,077	0,472 ±0,075	0,993 ±0,011	1,200 ±0,129
Cardiolipides µmoles	0,059 ±0,006	0,076 ±0,010	0,121 ±0,009	0,286 ±0,023	0,691 ±0,053	0,893 ±0,017	1,154 ±0,220	1,566 ±0,160	2,310 ±0,170
Sphingomyélines µmoles	0,155 ±0,016	0,193 ±0,018	0,255 ±0,025	0,803 ±0,069	1,61 ±0,22	2,80 ±0,50	6,29 ±0,61	7,91 ±0,43	9,88 ±0,30

B/ Taux d'éther-phosphatides à éthanolamine, de cardiolipides et de sphingomyélines en p.cent de la teneur de l'adulte dans le cerveau au cours de la croissance.

Age	1 j.	3 j.	6 j.	10 j.	15 j.	21 j.	30 j.	42 j.	Adultes
Ether-phosphatides à éthanolamine	2,27	3,00	5,42	11,4	14,2	33,3	39,2	82,5	100
Cardiolipides	2,56	3,29	5,23	12,4	29,9	38,6	50,0	67,8	100
Sphingomyélines	1,57	1,92	2,58	8,14	16,3	28,4	63,5	80,2	100

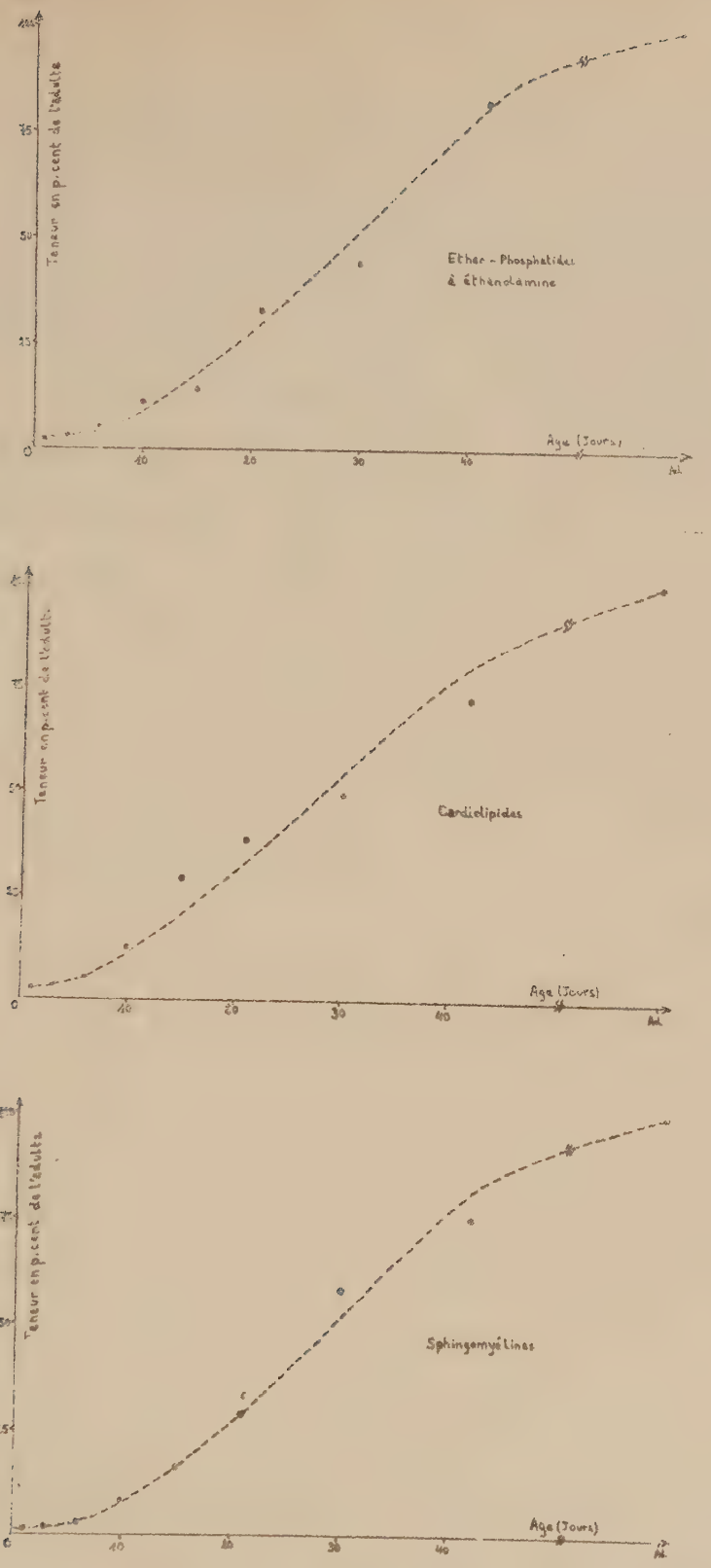


FIGURE XI. - Cerveau de Rat. Evolution du taux des éther-phosphatides à éthanolamines, des cardiolipides, des sphingo myélines au cours de la croissance post-natale. Résultats e p.cent de la teneur de l'adulte.

de nos expériences qu'à tout âge le cerveau contient des cardiolipides. Durant la période allant du 1er jour de la vie post-natale à l'âge adulte, l'augmentation totale de ces phosphatides est de l'ordre de 1 à 40, donc du même ordre de grandeur que pour les acétalphosphatides et les éther-phosphatides (Tableau XII) et les variations de leur néosynthèse suivent le même rythme que celles de ces composés (Fig. XI). 12 p. 100 seulement de la quantité que possède le cerveau adulte sont présents à 10 jours. La synthèse la plus intense se situe entre le 10è et le 42è jour, soit au cours des périodes de myélinisation.

- Sphingomyélines.

L'augmentation des sphingomyélines entre la naissance et l'âge adulte se révèle être la plus élevée de tous les phosphatides: 1 à 64 (Tableau XII). De plus, la néosynthèse de ces composés est très faible avant le 10è jour de la vie post-natale (Fig. XI). A cette date on ne trouve en effet, que 8,1 p. 100 de la teneur de l'adulte. Comme pour les plasmalogènes, la synthèse augmente de façon très notable à partir de cette date et s'étend sur toute la période de la myélinisation. L'existence de la synthèse rapide des sphingomyélines durant la myélinisation a déjà été rapportée par BIETH (18), MANUKYAN et coll. (146), ANSELL et coll. (7) dans le cas du cerveau de Rat, par EDGAR et coll. (64) et DAVISON (41) dans celui de Lapin ainsi que par CUMMINGS et

coll. (39) dans le cerveau humain sans que toutefois la comparaison avec tous les autres phospholipides ait été établie comme c'est le cas dans notre travail.

- Inositides.

De nombreux auteurs ont rapporté la présence d'inositolphosphatides dans le cerveau adulte (52, 53, 96, 131, 150). ROSSITER et coll. (189), WELLS et coll. (225) et d'autres (146, 223) ont observé que la teneur en monophosphoinositides est plus élevée que celle en diphosphoinositides et triphosphoinositides.

Il résulte de nos expériences que le cerveau du jeune animal contient déjà les trois phosphoinositides, comme l'ont observé en même temps que nous, EICHBERG et HAUSER (114). Nos résultats consignés dans le tableau XIII montrent que l'accroissement de ces trois phosphatides diffère. Alors que l'augmentation des monophosphoinositides est de l'ordre de 1 à 12,5 durant la période envisagée, celle des diphosphoinositides et des triphosphoinositides est respectivement de 1 à 30 et de 1 à 42. De plus, la synthèse des monophosphoinositides est très intense avant le 10è jour, alors que celle des diphosphoinositides et triphosphoinositides reste faible (Fig. XII). Au 10è jour, on trouve par rapport à l'adulte, respectivement 29 p. 100 de monophosphoinositides et seulement 14 et 17 p. 100 de diphosphoinositides et triphosphoinositides. A partir de cette date la synthèse des polyphosphoinositides augmente brusquement, tandis que celle des

TABLEAU XIII

CERVEAU DE RAT

A/ Quantités absolues d'Inositides par cerveau au cours de la croissance.

Age	1 j.	3 j.	6 j.	10 j.	15 j.	21 j.	30 j.	42 j.	Adultes
Phosphatidyl-inositols µmoles	0,315 ±0,024	0,46 ±0,044	0,78 ±0,047	1,20 ±0,083	1,66 ±0,10	1,82 ±0,21	2,94 ±0,28	3,57 ±0,13	4,10 ±0,16
Phosphatidyl-inositols phosphate µmoles	0,017 ±0,003	0,025 ±0,005	0,046 ±0,002	0,075 ±0,014	0,089 ±0,010	0,146 ±0,009	0,316 ±0,018	0,356 ±0,019	0,523 ±0,024
Phosphatidyl-inositols diphosphate µmoles	0,014 ±0,002	0,025 ±0,004	0,060 ±0,007	0,103 ±0,004	0,147 ±0,019	0,178 ±0,019	0,328 ±0,030	0,512 ±0,019	0,603 ±0,027

B/ Taux d'inositides en p. cent de la teneur de l'adulte dans le cerveau au cours de la croissance.

Age	1 j.	3 j.	6 j.	10 j.	15 j.	21 j.	30 j.	42 j.	Adultes
Phosphatidyl-inositols	7,93	11,2	19,0	29,2	40,5	44,4	71,6	87,0	100
Phosphatidyl-inositols phosphates	3,25	4,78	8,80	14,3	17,0	27,9	60,6	68,0	100
Phosphatidyl-inositols diphosphate	2,33	4,15	10,0	17,1	24,4	29,6	54,5	84,8	100

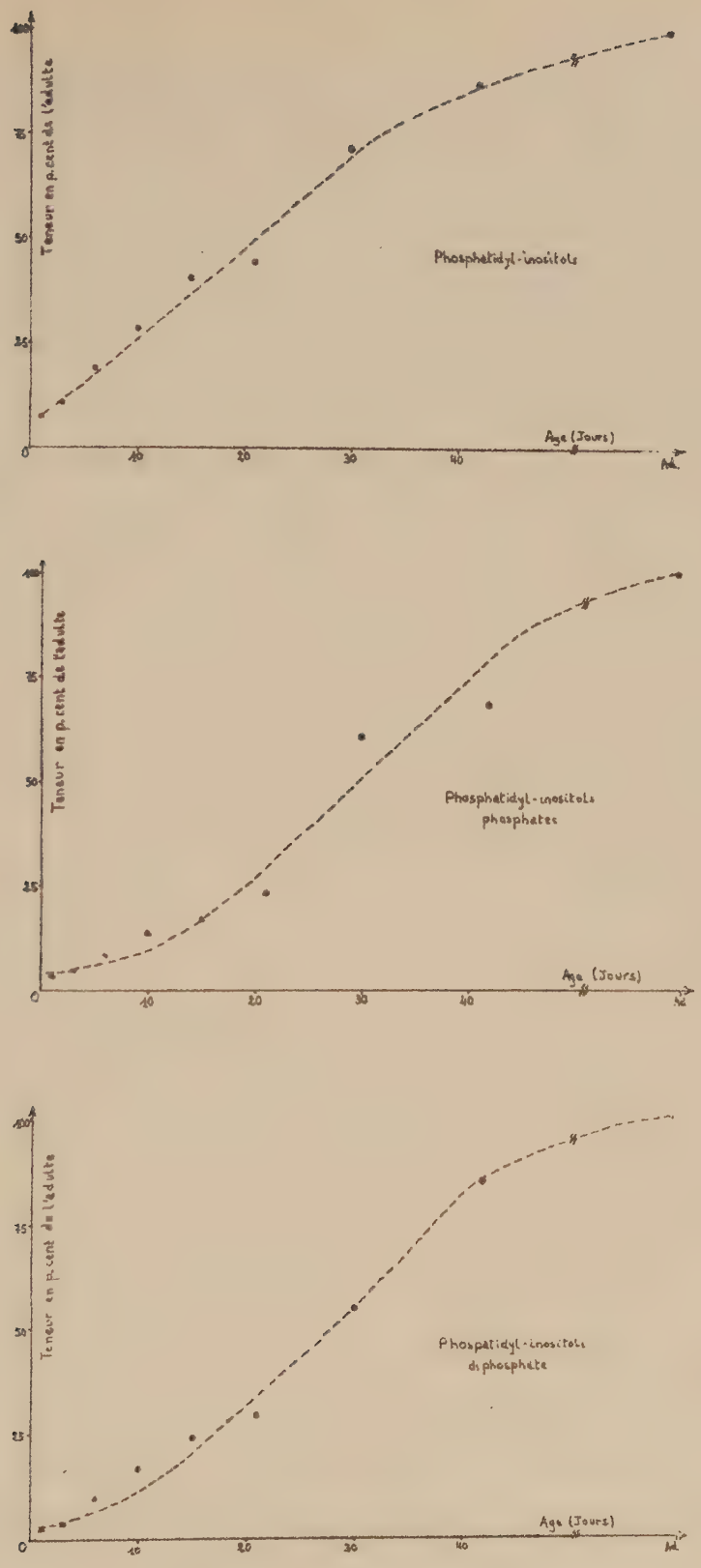


FIGURE XII. - Cerveau de Rat. Evolution du taux des divers inositides au cours de la croissance post-natale. Résultats en p.cent de la teneur de l'adulte.

monophosphoinositides suit la même pente que celle de la première étape du développement cérébral. L'accumulation de ces trois composés devient sensiblement parallèle et ceci jusqu'au 31è jour, date à laquelle on assiste à un ralentissement de l'accroissement du taux des monophosphoinositides, alors que celui des polyphosphoinositides se poursuit au même rythme jusqu'au 42è jour. Il ressort donc de ces expériences que la néosynthèse des phosphoinositides se limite pour une grande part, au stade des monophosphoinositides avant et pendant la première étape de la myélinisation, comme c'est le cas pour les phosphatidyl-cholines, éthanolamines et sérines. La formation des polyphosphoinositides, faible avant le 10è jour, augmente de façon très notable à partir de cette date et reste importante tout au long de la myélinisation.

f) Discussion.

Une des caractéristiques fondamentales du développement post-natal du système nerveux de Rat est l'accroissement de tous les phospholipides qu'il contient, mais le rythme de leur néosynthèse diffère de l'un à l'autre. On peut ainsi classer les divers phosphatides en deux groupes bien distincts (Tableau XIV). Le premier renferme les phosphatidyl-cholines, les phosphatidyl-éthanolamines, les phosphatidyl-sérines et les phosphatidyl-inositols. Les plasmalogènes à choline, éthanolamine et sérine, les éther-phosphatides à éthanolamine, les cardiolipides, les sphingomyélines, les phosphatidyl-inositols phosphate et les phosphatidyl-inositols

TABLEAU XIV

VALEURS DES PENTES D'ACCROISSEMENT DE LA TENEUR EN PHOSPHOLIPIDES DU CERVEAU DE RAT AU COURS DE SON DEVELOPPEMENT POST-NATAL.

A/ Phosphatides du premier groupe.

Périodes	1 - 10j.	10-30 j.	30-42 j.
Phosphatidyl-cholines	0,77	1,30	0,26
Phosphatidyl-éthanolamines	0,72	1,21	0,29
Phosphatidyl-sérines	0,74	1,10	0,28
Phosphatidyl-inositols	0,86	0,86	0,34
Moyennes	0,77	1,13	0,29

B/ Phosphatides du deuxième groupe.

Périodes	1 - 10j.	10-30j.	30-42 j.
Plasmalogènes à choline	0,32	0,90	0,90
Plasmalogènes à éthanolamine	0,26	0,90	0,90
Plasmalogènes à sérine	0,28	0,92	0,92
Ether-phosphatides à éthanolamine	0,28	0,92	0,92
Cardiolipides	0,30	0,92	0,92
Sphingomyélines	0,16	1,02	1,02
Phosphatidyl-inositols phosphate	0,25	0,95	0,95
Phosphatidyl-inositols diphosphate	0,29	0,96	0,96
Moyennes	0,27	0,94	0,94

diphosphate forment le deuxième groupe. Durant la période de croissance allant du premier jour de la vie post-natale à l'âge adulte, on note qu'avant le 10è jour les valeurs des pentes d'accroissement des phosphatides du premier groupe, de l'ordre de 0,77, sont bien plus élevées que celles des composés du deuxième groupe, qui se situent autour de 0,29. Entre le 10è et le 30è jour de la vie post-natale, les valeurs des pentes augmentent légèrement pour les lipides du premier groupe et se stabilisent autour de 1,13. Dans le cas des phosphatides du deuxième groupe l'accroissement des pentes est bien plus élevé et atteint en moyenne 0,94, valeurs sensiblement du même ordre de grandeur que celles obtenues pour les composés du premier groupe. Durant la période allant du 30è au 42è jour, on assiste à un abaissement des valeurs de la pente dans le cas des phosphatides du premier groupe qui se situent autour de 0,29, alors que dans le deuxième groupe les valeurs restent inchangées.

Ces données nous permettent de distinguer dans le développement biochimique post-natal du cerveau de Rat trois étapes qui se superposent à celles du développement histologique. La première étape s'étend de la naissance au 10è jour et correspond à la période durant laquelle existe encore une prolifération cellulaire. Elle est caractérisée par une néosynthèse intense des phosphatides du premier groupe, alors que celle des composés du deuxième groupe reste très faible.

Au cours de la deuxième étape allant du 10è au 30è jour, l'accumulation des phosphatides du premier groupe suit la même pente que celle obtenue durant la première étape. Parallèlement on assiste à un accroissement très intense de la synthèse des composés du deuxième groupe. Cette deuxième étape biochimique correspond à la période de myélinisation intense.

La troisième étape débute au 30è jour et correspond à la période de maturation finale du cerveau. Elle est caractérisée par le ralentissement de la néoformation des phosphatides du premier groupe, alors que la synthèse de ceux du deuxième groupe reste encore très intense et ne se ralentit qu'au-delà du 42è jour.

Les différentes périodes histologiques du développement du cerveau de Rat correspondent donc à une réalité biochimique.

B. Développement biochimique du cerveau de Poulet.

a) Introduction.

Afin de préciser dans quelles mesures les phénomènes observés au cours du développement du cerveau de Rat correspondent à un schéma général de l'ontogénèse du système nerveux central, nous avons entrepris l'étude de l'évolution des divers phosphatides au cours de la croissance du cerveau de Poulet. L'ontogénèse du cerveau de Poulet atteignant un degré de développement très avancé durant la vie embryonnaire, nous avons suivi l'évolution des divers constituants qui

nous intéressent, avant et après l'éclosion. Il est curieux de constater que depuis les travaux de BIETH et MANDEL (17) en 1950 et de LESLIE et DAVIDSON (136) en 1951, ce sujet n'a pas été repris. Ce n'est que récemment et parallèlement à la parution de nos travaux dans ce domaine, que des résultats fragmentaires sur les phospholipides du cerveau de Poulet ont été rapportés (31, 68, 148, 200).

Nous avons opéré sur des cerveaux de Poulet d'un âge variant du 7è jour de la vie embryonnaire à 18 mois après l'éclosion. Au cours de cette période, le poids frais du cerveau augmente dans les proportions de 1 à 83 et le poids sec de 1 à 200 (Tableau XV). Ceci indique une diminution progressive de la teneur en eau qui passe de 90,8 p. 100 à 77,5 p. 100.

b) Acide désoxyribonucléique.

Durant la période envisagée, la quantité d'ADN par cerveau évalué en µmoles de désoxyribonucléotides passe de 0,260 µmoles à 6,01 µmoles par cerveau (Tableau XV). Ainsi après 7 jours d'incubation, c'est-à-dire qu'au terme du premier tiers de la vie embryonnaire, le cerveau contient à peine 5 p. 100 de la totalité de ses cellules si on considère que tous les noyaux sont diploïdes. La néosynthèse se poursuit régulièrement jusqu'à l'éclosion, délai auquel le cerveau contient 37 p. 100 de l'ADN de l'adulte (Fig. XIII). L'accroissement de l'ADN continue encore au même rythme que durant la dernière phase embryonnaire pour se ralentir à

TABLEAU XV

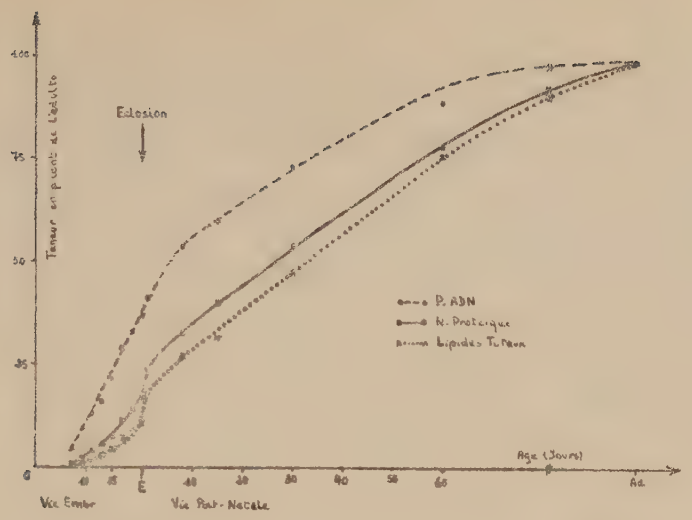
CERVEAU DE POULET

A/ Poids frais, Poids sec, ADN, N protéique par cerveau au cours de la croissance embryonnaire et post-natale.

	VIE EMBRYONNAIRE								VIE POST-NATALE					
Age	7 j.	9 j.	11 j.	13 j.	15 j.	17 j.	19 j.	21 j.	1 j.	8 j.	15 j.	30 j.	60 j.	Adultes
Poids frais g	0,040 ±0,03	0,128 ±0,014	0,205 ±0,012	0,312 ±0,021	0,448 ±0,024	0,647 ±0,021	0,712 ±0,046	0,778 ±0,045	0,904 ±0,028	1,18 ±0,024	1,38 ±0,022	1,88 ±0,064	2,72 ±0,065	3,43 ±0,026
Poids sec mg	3,70 ±0,10	10,0 ± 0,43	24,7 ± 0,30	36,2 ± 0,57	48,5 ± 0,25	83,1 ± 1,03	110 ±1,50	149 ± 4,24	160 ± 1,00	210 ± 6,82	251 ± 18,2	352 ±18,1	509 ± 10,9	734 ± 26,5
P ADN µmoles	0,260 ±0,008	0,580 ±0,040	0,790 ±0,015	0,97 ±0,088	1,29 ±0,103	1,72 ±0,112	2,01 ±0,262	2,21 ±0,223	2,45 ±0,096	3,25 ±0,17	3,57 ±0,285	4,37 ±0,322	5,34 ±0,156	6,01 ±0,421
N Protéique mg	0,32 ±0,021	0,97 ±0,085	1,89 ±0,144	2,79 ±0,186	3,74 ±0,228	5,74 ±0,618	7,05 ±0,666	8,50 ±0,947	12,2 ± 0,10	16,5 ±0,46	20,1 ±0,35	26,9 ±0,98	39,3 ± 2,34	50,2 ± 1,96

B/ Taux d'ADN et de N protéique en p. cent de la teneur de l'adulte dans le cerveau au cours de la croissance.

	VIE EMBRYONNAIRE								VIE POST-NATALE					
Age	7 j.	9 j.	11 j.	13 j.	15 j.	17 j.	19 j.	21 j.	1 j.	8 j.	15 j.	30 j.	60 j.	Adultes
P ADN	4,30	9,40	13,0	16,0	21,5	29,0	33,0	37,0	41,0	54,0	60,0	73,0	89,0	100
N protéique	0,66	1,93	3,77	5,56	7,45	11,5	14,1	17,0	24,2	32,8	40,0	53,6	78,4	100



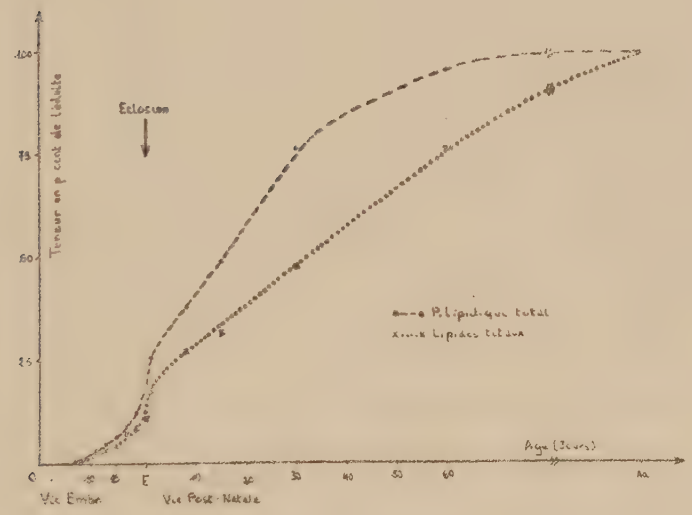


FIGURE XIII. Cerveau de Poulet. Evolution du taux du DNA, des protéines, des lipides et des phospholipides au cours de la croissance embryonnaire et post-natale. Résultats en p.cent de la teneur de l'adulte.

partir du 8è jour de la vie post-natale et s'achever à l'âge de 2 mois environ. Contrairement au cerveau de Rat, la prolifération cellulaire du cerveau de Poulet s'étend sur une période très longue comme l'a déjà observé BIETH (18). Il importe de souligner qu'il existe encore chez le Poulet une néoformation cellulaire très importante lorsqu'aux environs du 15è jour de la vie embryonnaire débutent les phénomènes de myélinisation (1, 18, 86, 182). En effet, à cette date on ne trouve que 21,5 p. 100 des quantités de l'ADN de l'adulte, alors que chez le Rat 70 p. 100 de la totalité de l'ADN sont déjà présents lorsque la myélinisation débute. Il serait intéressant de savoir si les noyaux formés après l'éclosion appartiennent à des cellules neuronales ou à des cellules gliales. Les données chimiques ne permettent pas de répondre à cette question. Il semble cependant que l'on puisse imputer la division cellulaire post-natale aux cellules gliales, car contrairement au jeune Rat, le Poussin de 1 jour est un être autonome, ce qui permet de penser que de loin la majorité des neurones sont présents à cette époque.

c) Protéines.

La néosynthèse des protéines au cours du développement cérébral suit un rythme différent de celui de l'ADN. La teneur en protéines évaluée par l'azote aminé et amidé passe de 0,33 mg par cerveau à 7 jours à 50,2 mg chez l'adulte, soit un accroissement de 1 à 152 (Tableau XV). Le rythme de la néoformation des protéines permet de distinguer plusieurs

périodes (Fig. XIII): une première s'étend jusqu'au 19è jour de la vie embryonnaire; elle est caractérisée par une accumulation régulière de ces composés. La deuxième étape se situe entre l'avant-dernier jour de la fin de la vie embryonnaire et le premier jour de la vie post-natale. Durant cette période, la synthèse des protéines est très intense, puisque la teneur en azote protéique double en l'espace de 72 heures. Au cours de la troisième étape, qui débute un jour après l'éclosion, la synthèse des protéines se ralentit et reste régulière jusqu'au 60è jour.

d) Lipides.

Comme pour le cerveau de Rat, l'accroissement total des lipides au cours de la période envisagée de 1 à 406, est supérieur à celui des protéines (Tableau XVI). Mais alors que le rythme de la néosynthèse des lipides du cerveau de Rat différait nettement de celui des protéines, le rythme d'accumulation de ces deux substances est sensiblement parallèle chez le Poulet (Fig. XIII). Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que la multiplication cellulaire s'échelonne sur une période plus longue chez le Poulet que chez le Rat.

e) Phosphatides.

L'ensemble des phosphatides accuse une augmentation de l'ordre de 1 à 345 entre le 7è jour de la vie embryonnaire et l'âge adulte (Tableau XVI), soit plus faible que celle de l'ensemble des lipides (1 à 406). La néosynthèse des phospholipides, régulière jusqu'au 19è jour de la vie embryonnaire,

TABLEAU XVI

CERVEAU DE POULET

A/ Quantités absolues de lipides et de phospholipides par cerveau au cours de la croissance embryonnaire et post-natale.

	VIE EMBRYONNAIRE								VIE POST-NATALE					
Age	7 j.	9 j.	11 j.	13 j.	15 j.	17 j.	19 j.	21 j.	1 j.	8 j.	15 j.	30 j.	60 j.	Adultes
Lipides totaux mg	0,67 ±0,031	2,97 ±0,29	4,85 ±0,40	7,56 ±0,44	11,50 ±0,78	19,3 ±0,73	22,7 ±1,90	28,8 ±1,58	47,2 ±1,09	73,5 ±1,22	86,2 ±1,68	129,0 ± 5,45	204,0 ±20,0	272,0 ±14,4
P Lipidique total µmoles	0,606 ±0,036	2,40 ±0,29	5,17 ±0,51	8,46 ±0,29	12,8 ±1,07	19,2 ±0,72	25,3 ±2,16	37,3 ±1,54	53,4 ±1,12	79,1 ±4,08	102,6 ±2,79	159,8 ±11,0	200,0 ±11,4	209,0 ± 5,91

B/ Taux de lipides et de phospholipides en p. cent de la teneur de l'adulte dans le cerveau au cours de la croissance.

	VIE EMBRYONNAIRE								VIE POST-NATALE					
Age	7 j.	9 j.	11 j.	13 j.	15 j.	17 j.	19 j.	21 j.	1 j.	8 j.	15 j.	30 j.	60 j.	Adultes
Lipides totaux	0,25	1,10	1,78	2,78	4,22	7,10	8,35	10,6	17,4	27,0	31,7	47,5	76,2	100
P lipidique total	0,29	1,15	2,47	4,05	6,13	9,17	12,1	17,8	25,5	37,9	49,0	76,4	95,5	100

s'intensifie considérablement au moment de l'éclosion, c'est-à-dire entre le 19è jour de la vie embryonnaire et le premier jour de la vie post-natale (Fig. XIII). A partir de ce moment, la synthèse des phospholipides continue régulièrement à un rythme plus atténué jusqu'aux environs du 30è jour de la vie post-natale. A ce délai on assiste encore une fois à un ralentissement notable du rythme d'accumulation de ces composés. Il ressort de ces données que le rythme de la néosynthèse des phosphatides est beaucoup plus rapide que celui d'autres lipides, comme nous l'avons déjà observé dans le cas du cerveau de Rat. Il existe cependant des différences dans l'évolution individuelle des divers phosphatides au cours du développement cérébral du cerveau de Poulet.

- Phosphatidyl-cholines, phosphatidyl-éthanolamines, phosphatidyl-sérines.

Le cerveau de l'embryon de 7 jours, comme celui de l'adulte, renferme des phosphatidyl-cholines, éthanolamines et sérines; la teneur en phosphatidyl-cholines est toujours la plus élevée et celle en phosphatidyl-sérines la plus faible. Au cours de la période de croissance étudiée, les phosphatidyl-cholines augmentent dans des proportions de 1 à 173, ceux à éthanolamine de 1 à 337 et ceux à sérines de 1 à 235 (Tableau XVII). Bien que l'accroissement de la quantité absolue de chacun de ces composés diffère, leur rythme d'accumulation au cours du développement cérébral se révèle être similaire (Fig. XIV). Leur synthèse est déjà très intense

TABLEAU XVII

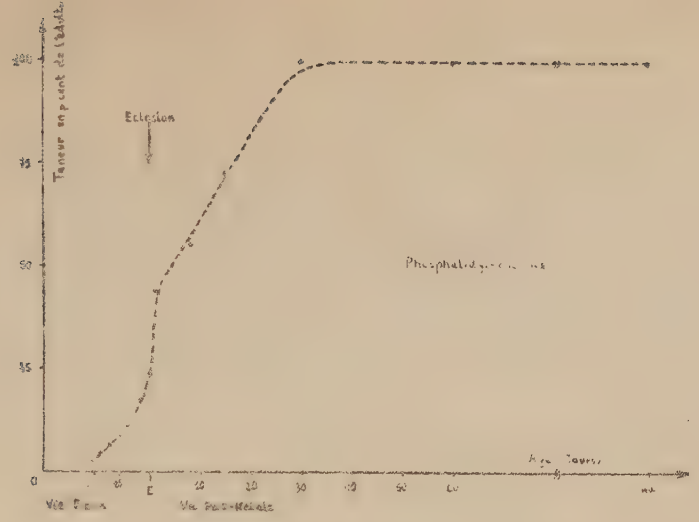
CERVEAU DE POULET

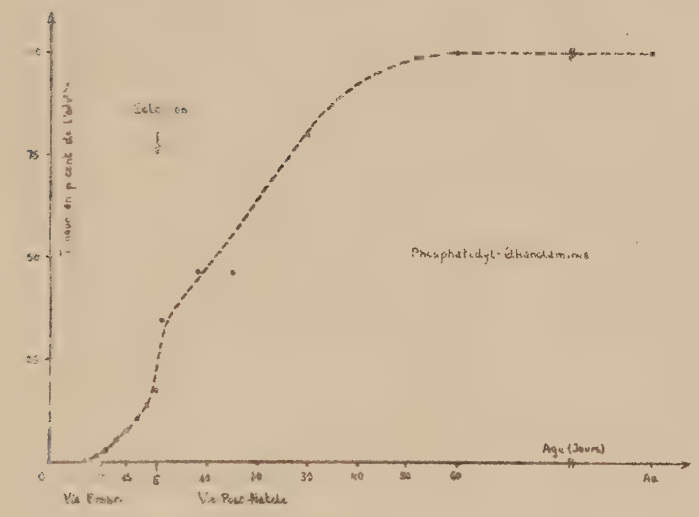
A/ Quantités absolues de phosphatidyl-cholines, phosphatidyl-éthanolamines et phosphatidyl-sérines par cerveau au cours de la croissance embryonnaire et post-natale.

	VIE EMBRYONNAIRE								VIE POST-NATALE					
Age	7 j.	9 j.	11 j.	13 j.	15 j.	17 j.	19 j.	21 j.	1 j.	8 j.	15 j.	30 j.	60 j.	Adultes
Phosphatidyl-cholines µmoles	0,34 ±0,03	1,27 ±0,16	2,81 ±0,14	4,24 ±0,23	5,73 ±0,35	8,71 ±0,36	11,26 ± 1,38	15,50 ± 0,83	28,40 ± 2,25	35,60 ± 0,60	46,75 ± 3,73	66,10 ± 9,02	65,55 ± 2,69	64,60 ± 2,14
Phosphatidyl-éthanol-amines µmoles	0,11 ±0,012	0,35 ±0,09	0,99 ±0,11	1,88 ±0,32	2,55 ±0,41	3,65 ±0,49	4,83 ±0,16	6,00 ±0,20	12,00 ± 2,57	16,05 ± 2,45	15,9 ± 1,47	31,30 ± 7,23	34,7 ± 4,50	34,5 ± 3,97
Phosphatidyl-sérines µmoles	0,056 ±0,003	0,338 ±0,019	0,441 ±0,016	0,745 ±0,014	1,04 ±0,087	1,89 ±0,036	2,96 ±0,048	3,50 ±0,23	4,53 ± 0,23	6,63 ± 0,54	8,12 ± 0,80	10,83 ± 0,99	13,32 ± 1,47	13,25 ± 1,32

B/ Taux de phosphatidyl-cholines, phosphatidyl-éthanolamines et phosphatidyl-sérines en p.cent de la teneur de l'adulte dans le cerveau au cours de la croissance.

	VIE EMBRYONNAIRE								VIE POST-NATALE					
Age	7 j.	9 j.	11 j.	13 j.	15 j.	17 j.	19 j.	21 j.	1 j.	8 j.	15 j.	30 j.	60 j.	Adultes
Phosphatidyl-cholines	0,56	1,98	4,60	6,54	8,87	13,5	17,4	24,0	44,0	55,1	72,5	102	101	100
Phosphatidyl-éthanol-amines	0,31	1,02	2,88	5,45	7,40	10,5	14,0	17,4	34,8	46,5	46,0	80	100	100
Phosphatidyl-sérines	0,42	2,55	3,33	5,63	7,85	14,3	22,4	26,4	34,2	50,0	61,2	81,6	101	100





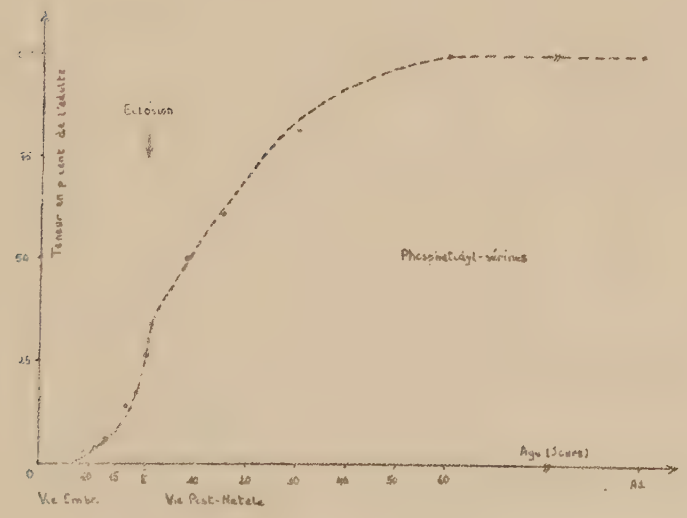


FIGURE XIV. - Cerveau de Poulet. Evolution du taux des phosphatidyl-cholines, phosphatidyl-éthanolamines et phosphatidyl-sérines au cours de la croissance embryonnaire et post-natale. Résultats en p.cent de la teneur de l'adulte.

avant le 19è jour de la vie embryonnaire. Au cours de la période d'éclosion, c'est-à-dire entre le 19è jour de la vie embryonnaire et le 1er jour de la vie post-natale, la synthèse des phosphatidyl-dérivés s'intensifie considérablement. En effet, au cours de cette courte période, la teneur relative par rapport aux phospholipides de l'adulte des phosphatidyl-cholines passe de 17,4 p. 100 à 44,0 p. 100, celle des phosphatidyl-éthanolamines de 14,0 p. 100 à 34,8 p. 100 et celle des phosphatidyl-sérines de 22,4 à 34,2 p. 100, c'est-à-dire qu'en moyenne l'augmentation relative des quantités de phosphatidyl-dérivés est de 6,5 p. 100 en 24 heures, alors qu'elle était seulement de 1,50 p. 100 en 24 heures avant le 19è jour de la vie embryonnaire. Le rythme de la néoformation de ces trois composés diminue ensuite et reste régulier jusqu'au 30è jour de la vie post-natale; on assiste ensuite à un ralentissement très notable de la synthèse de ces composés. Plus de 80 p. 100 de la teneur de l'adulte sont déjà présents à ce délai. Ainsi d'après le rythme de la néosynthèse des phosphatidyl-dérivés on peut distinguer trois étapes (Fig. XIV).:

- la première s'étend jusqu'au 19è jour de la vie embryonnaire; elle est caractérisée par une synthèse déjà très intense de ces composés.
- au cours de la deuxième étape qui se situe entre le 19è jour de la vie embryonnaire et le 1er jour de la vie post-natale, le rythme de synthèse des phosphatides s'intensifie considérablement.

- la trosième étape s'étend du 1er au 30è jour de la vie post-natale. Au cours de celle-ci le rythme de la néosynthèse des phosphatidyl-dérivés se révèle être semblable à celui de la première étape.

- Plasmalogènes.

Au cours de la période de croissance envisagée, l'augmentation des plasmalogènes à choline, éthanolamine et sérine est de l'ordre de 1 à 750, augmentation bien plus considérable que celle des phosphatidyl-dérivés correspondants (Tableau XVIII). Comme dans le cerveau de Rat, les acétalphosphatides à éthanolamine prédominent à tout âge par rapport aux autres plasmalogènes. La biosynthèse des plasmalogènes au cours du développement cérébral, reste très faible jusqu'au 15è jour de la vie embryonnaire. A cette date la teneur en plasmalogène par rapport à celle de l'adulte est de 3,19 p. 100 pour les dérivés à cholines, 2,72 p. 100 pour ceux à éthanolamines et 4,67 p. 100 pour ceux à sérine, taux nettement plus faible que celui des phosphatidyl-dérivés correspondants qui est en moyenne de l'ordre de 8 p. 100 (Tableau XVIII). A partir du 15è jour de la vie embryonnaire, le rythme de la néosynthèse des plasmalogènes augmente de façon très notable. Leur accumulation suit le même rythme jusqu'au 60è jour de la vie post-natale, date où l'on assiste à un ralentissement de la synthèse de ces composés. Ainsi, contrairement aux phosphatidyl-dérivés, la néosynthèse des plasmalogènes (Fig. XV), faible avant le 15è jour de la vie embryonnaire, devient très intense à partir de ce délai,

TABLEAU XVIII

CERVEAU DE POULET

A/ Quantités absolues de plasmalogènes par cerveau au cours de la croissance embryonnaire et post-natale.

	VIE EMBRYONNAIRE								VIE POST-NATALE					
Age	7 j.	9 j.	11 j.	13 j.	15 j.	17 j.	19 j.	21 j.	1 j.	8 j.	15 j.	30 j.	60 j.	Adultes
Plasmalogènes à choline µmoles	0,007 ±0,002	0,069 ±0,010	0,091 ±0,012	0,137 ±0,009	0,22 ±0,025	0,38 ±0,079	0,48 ±0,073	0,68 ±0,086	0,93 ±0,18	1,25 ±0,20	3,47 ±0,19	4,81 ±0,41	6,04 ±0,22	6,92 ±0,60
Plasmalogènes à éthanolamine µmoles	0,058 ±0,004	0,237 ±0,058	0,420 ±0,10	0,700 ±0,12	1,18 ±0,08	2,46 ±0,26	3,18 ±0,14	4,03 ±0,25	5,55 ±0,13	12,15 ± 0,98	16,58 ± 1,38	24,53 ± 0,84	40,95 ± 1,16	43,27 ± 3,73
Plasmalogènes à sérine µmoles	- -	0,018 ±0,003	0,043 ±0,010	0,064 ±0,016	0,223 ±0,010	0,359 ±0,014	0,404 ±0,040	0,48 ±0,032	0,56 ±0,019	0,75 ±0,067	1,25 ±0,057	2,32 ±0,12	3,91 ±0,24	4,77 ±0,37

B/ Taux de plasmalogènes en p. cent de la teneur de l'adulte dans le cerveau au cours de la croissance.

	VIE EMBRYONNAIRE								VIE POST-NATALE					
Age	7 j.	9 j.	11 j.	13 j.	15 j.	17 j.	19 j.	21 j.	1 j.	8 j.	15 j.	30 j.	60 j.	Adultes
Plasmalogènes à choline	0,13	1,00	1,32	2,00	3,19	5,50	6,95	9,83	13,5	18,1	50,1	69,5	87,3	100
Plasmalogènes à éthanolamine	0,13	0,55	0,97	1,62	2,73	5,68	7,35	9,32	12,8	28,1	38,3	56,7	94,5	100
Plasmalogènes à sérine	-	0,38	0,90	1,34	4,67	7,62	8,45	10,1	11,8	15,9	26,2	48,5	82,0	100

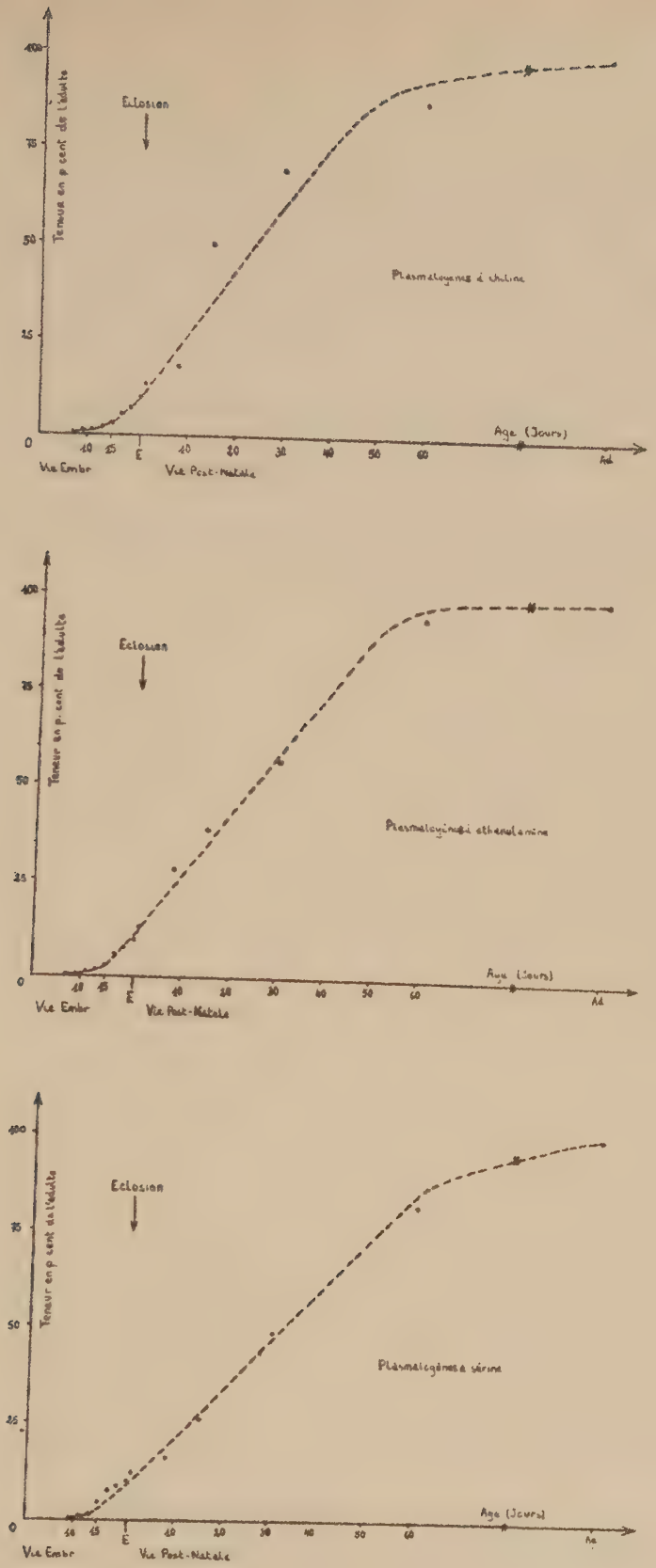


FIGURE XV. - Cerveau de Poulet. Evolution du taux des divers plasmalogènes au cours de la croissance embryonnaire et post-natale. Résultats en p.cent de la teneur de l'adulte.

c'est-à-dire lorsque débute la myélinisation. Toutefois, on n'observe pas le changement dramatique du rythme de la néosynthèse pendant la période d'éclosion mis en évidence pour d'autres composés. Comme chez le Rat, la néoformation des plasmalogènes du cerveau de Poulet est donc liée aux phénomènes de la myélinisation.

- Ether-phosphatides à éthanolamine.

La teneur en éther-phosphatides à éthanolamine du cerveau de Poulet passe de 0,0065 µmoles par cerveau chez l'embryon de 7 jours à 7,95 µmoles chez l'adulte, ce qui représente une augmentation totale de 1 à 1240 (Tableau XIX). Bien que l'accroissement relatif soit plus important que celui des plasmalogènes correspondants, la néosynthèse des éther-phosphatides à éthanolamine au cours de la période envisagée se fait selon un rythme analogue à celui des acétalphosphatides (Fig. XVI). En effet, on observe une synthèse très faible avant le 15è jour de la vie embryonnaire où l'on ne trouve que 4,65 p. 100 des quantités de l'adulte. La néoformation devient très intense à partir de ce délai, c'est-à-dire lorsque débute la myélinisation et suit le même rythme jusqu'aux environs du 60è jour, période à laquelle l'accumulation se ralentit pour atteindre les valeurs de l'adulte.

- Cardiolipides.

L'augmentation totale des cardiolipides au cours de la période étudiée est de l'ordre de 1 à 795 (Tableau XIX), soit sensiblement du même ordre de grandeur que celle des plasma-

TABLEAU XI/

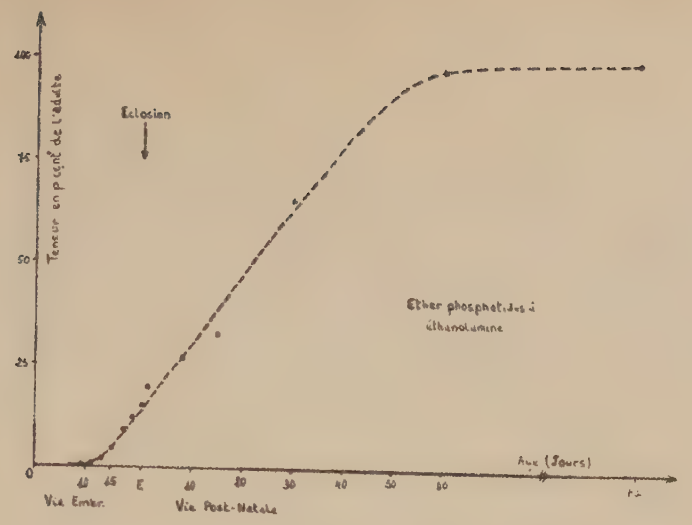
CERVEAU DE POULET

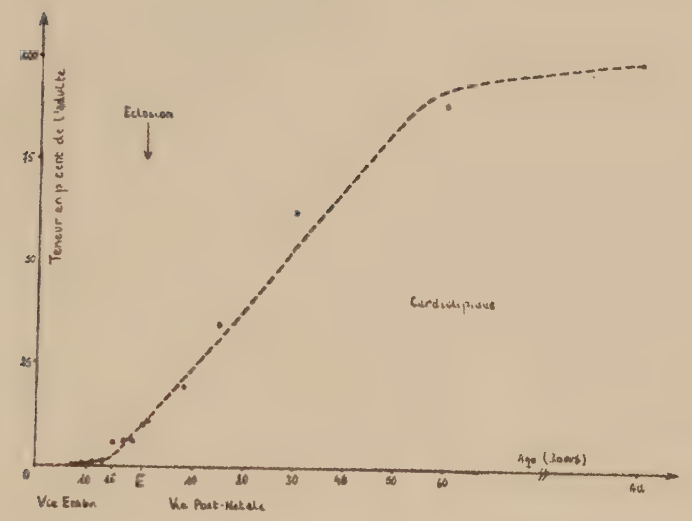
A/ Quantités absolues d'éther-phosphatides à éthanolamine, de cardiolipides et de sphingomyélines par cerveau au cours de la croissance embryonnaire et post-natale.

	VIE EMBRYONNAIRE								VIE POST-NATALE					
Age	7 j.	9 j.	11 j.	13 j.	15 j.	17 j.	19 j.	21 j.	1 j.	8 j.	15 j.	30 j.	60 j.	Adultes
Ether phosphatides à éthanolamine	0,0065	0,024	0,070	0,180	0,370	0,720	0,930	1,20	1,54	2,09	2,59	5,21	7,75	7,95
µmoles	±0,0005	±0,0005	±0,0039	±0,040	±0,100	±0,056	±0,27	±0,27	±0,13	±0,29	±0,27	±0,13	±0,60	±0,34
Cardiolipides	0,0053	0,017	0,034	0,050	0,247	0,255	0,256	0,420	0,454	0,820	1,48	2,64	3,78	4,25
µmoles	±0,0015	±0,010	±0,007	±0,013	±0,011	±0,036	±0,016	±0,060	±0,028	±0,110	±0,175	±0,640	±0,305	±0,325
Sphingomyélines	0,0105	0,088	0,150	0,280	0,610	1,16	1,55	2,10	2,49	4,30	5,66	9,52	14,98	15,30
µmoles	±0,0004	±0,012	±0,028	±0,010	±0,021	±0,044	±0,077	±0,066	±0,012	±0,60	±0,24	±0,42	± 1,05	± 0,85

B/ Taux d'éther-phosphatides à éthanolamine, de cardiolipes et de sphingomyélines en p. cent de la teneur de l'adulte dans le cerveau au cours de la croissance.

	VIE EMBRYONNAIRE								VIE POST-NATALE					
Age	7 j.	9 j.	11 j.	13 j.	15 j.	17 j.	19 j.	21 j.	1 j.	8 j.	15 j.	30 j.	60 j.	Adultes
Ether phosphatides à éthanolamine	0,08	0,31	0,89	2,26	4,65	9,10	11,70	15,10	19,7	26,3	32,6	65,4	97,5	100
Cardiolipides	0,12	0,40	0,80	1,17	5,80	6,00	6,00	9,90	10,7	19,3	34,9	62,1	88,9	100
Sphingomyélines	0,07	0,57	0,98	1,83	4,00	7,58	10,10	13,70	16,3	28,1	37,0	62,3	98,0	100





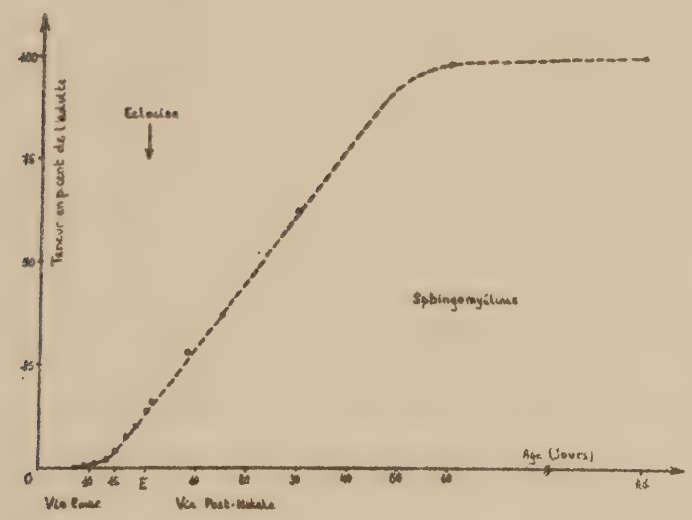


FIGURE XVI. - Cerveau de Poulet. Evolution du taux des éther phosphatides à éthanolamines, des cardiolipides et des sphingomyélines au cours de la croissance embryonnaire et post-natale. Résultats en p.cent de la teneur de l'adulte.

logènes et les variations de leur néosynthèse suivent le même rythme que celles de ces composés (Fig. XVI). Seulement 5,80 p. 100 de la teneur de l'adulte sont présents au 15è jour de la vie embryonnaire et la synthèse la plus intense de ces composés se situe au cours de la période de la myélinisation, c'est-à-dire entre le 15è jour de la vie embryonnaire et le deuxième mois de la vie post-natale.

- Sphingomyélines.

Comme dans le cerveau de Rat, les sphingomyélines du cerveau de Poulet représentent les phosphatides dont l'accroissement est le plus intense entre le 7è jour de la vie embryonnaire et l'âge adulte (Tab. XIX). Les quantités absolues augmentent dans les proportions de 1 à 1490 durant cette période. Ces composés ne se synthétisent que très lentement avant le 15è jour de la vie embryonnaire puisqu'à cette époque on ne trouve que 4,0 p. 100 des quantités présentes chez l'adulte. Par contre, lorsque débute la myélinisation, la néosynthèse des sphingomyélines subit un accroissement considérable. Cet accroissement se poursuit régulièrement jusqu'aux environs du 60è jour de la vie post-natale, date à laquelle on assiste au ralentissement de la synthèse de ces composés. C'est donc toujours au cours des phénomènes de la myélinisation que l'on assiste à la synthèse la plus intense des sphingomyélines (Fig. XVI).

- Inositides.

Il résulte de l'étude des inositides qu'au cours de la période du développement cérébral envisagée, l'augmentation des phosphatidyl-inositols est de l'ordre de 1 à 213, alors que celle des phosphatidyl-inositols phosphate et des phosphatidyl-inositols diphosphate se révèle être respectivement de l'ordre de 1 à 890 et de 1 à 1170 (Tableau XX). Par ailleurs, il existe un parallélisme entre le rythme d'accumulation des phosphatidyl-inositols et des phosphatidyl-cholines, éthanolamines et sérines d'une part, les polyphosphoinositides et les plasmalogènes d'autre part(Fig.XVII). En effet, la néosynthèse des monophosphoinositides déjà très intense avant le 15è jour de la vie embryonnaire, se poursuit régulièrement jusqu'au 19è jour où l'on trouve déjà 18,5 p. 100 des quantités de l'adulte. Au moment de l'éclosion, la synthèse de ces composés subit un brusque accroissement comme dans le cas des phosphatidyl-dérivés. Au-delà du 1er jour de la vie post-natale, la néoformation de ces phosphatides suit à nouveau la même pente que celle apparue avant la période de l'éclosion. Elle continue régulièrement jusqu'au 30è jour, date à laquelle on assiste à un brusque ralentissement de leur synthèse.

La néosynthèse des phosphatidyl-inositols phosphate et des phosphatidyl-inositols diphosphate par contre, est faible avant le 15è jour de la vie embryonnaire. En effet seulement 2,95 p. 100 de diphosphoinositides et 2,50 p. 100 de triphos-

TABLEAU XX

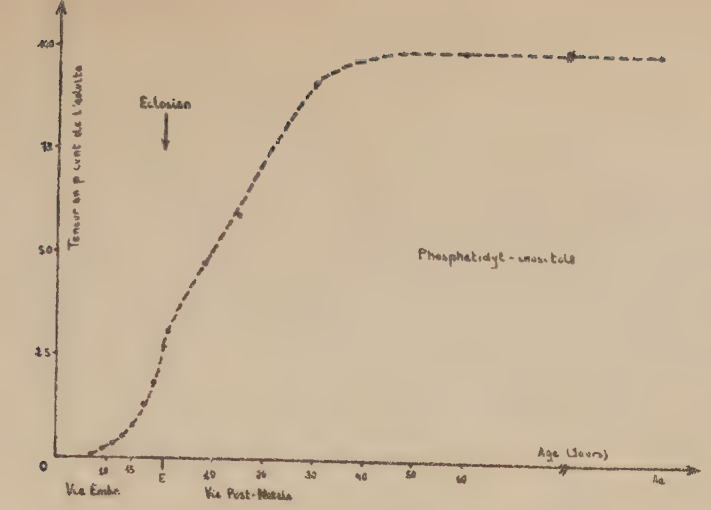
CERVEAU DE POULET

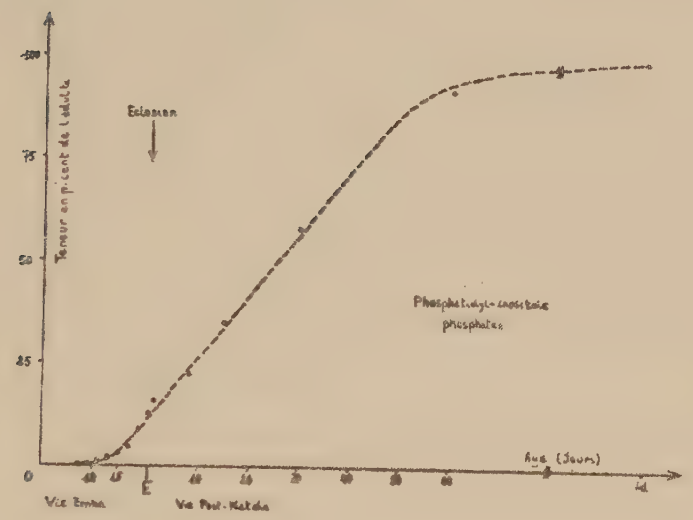
A/ Quantités absolues d'Inositides par cerveau au cours de la croissance embryonnaire et post-natale.

	VIE EMBRYONNAIRE								VIE POST-NATALE					
Age	7 j.	9 j.	11 j.	13 j.	15 j.	17 j.	19 j.	21 j.	1 j.	8 j.	15 j.	30 j.	60 j.	Adultes
Phosphatidyl-Inositols µmoles	0,027 ±0,0025	0,102 ±0,057	0,184 ±0,011	0,290 ±0,013	0,449 ±0,030	0,758 ±0,030	1,05 ±0,086	1,54 ±0,045	1,75 ±0,19	2,70 ±0,07	3,38 ±0,24	5,26 ±0,30	5,68 ±0,42	5,69 ±0,29
Phosphatidyl-Inositols-phosphate µmoles	0,0013 ±0,0002	0,0023 ±0,0002	0,013 ±0,0005	0,022 ±0,003	0,034 ±0,009	0,052 ±0,009	0,101 ±0,005	0,148 ±0,021	0,182 ±0,016	0,252 ±0,015	0,402 ±0,024	0,670 ±0,060	1,060 ±0,100	1,16 ±0,047
Phosphatidyl-Inositols-diphosphate µmoles	0,0010 ±0,0001	0,0012 ±0,0002	0,008 ±0,002	0,017 ±0,003	0,029 ±0,002	0,032 ±0,009	0,085 ±0,006	0,055 ±0,007	0,142 ±0,030	0,210 ±0,033	0,380 ±0,028	0,800 ±0,053	0,930 ±0,070	1,13 ±0,13

B/ Taux d'Inositides en P. cent de la teneur de l'adulte dans le cerveau au cours de la croissance.

	VIE EMBRYONNAIRE								VIE POST-NATALE					
Age	7 j.	9 j.	11 j.	13 j.	15 j.	17 j.	19 j.	21 j.	1 j.	8 j.	15 j.	30 j.	60 j.	Adultes
Phosphatidyl-Inositols	0,47	1,80	3,24	5,10	7,80	13,30	18,50	27,10	30,8	47,5	59,5	92,0	100	100
Phosphatidyl-Inositols phosphate	0,11	0,20	1,12	1,90	2,93	4,50	8,70	12,80	15,7	21,7	34,7	57,7	91,4	100
Phosphatidyl-Inositols diphosphate	0,09	0,11	0,71	1,50	2,57	2,83	7,52	4,90	12,5	19,5	33,6	70,7	82,2	100





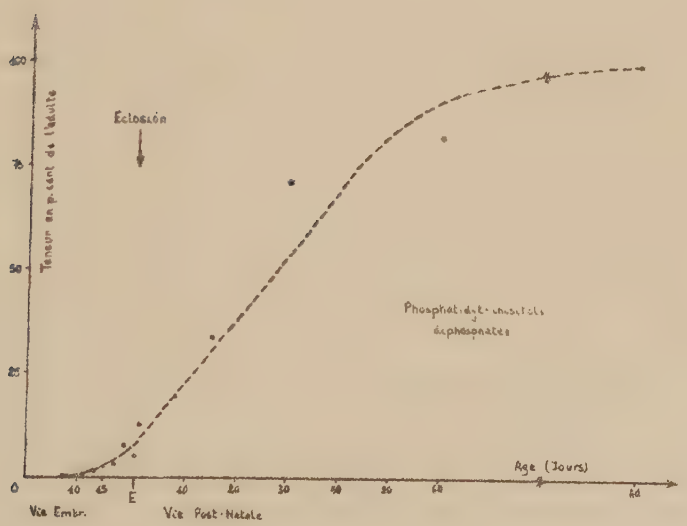


FIGURE XVII. - Cerveau de Poulet. Evolution du taux des divers inositides au cours de la croissance embryonnaire et post-natale. Résultats en p.cent de la teneur de l'adulte.

phoinositides des teneurs de l'adulte sont présents à cet âge, contre 7,90 p. 100 de monophosphoinositides. Au-delà de cette date, la néoformation devient très intense et se poursuit régulièrement jusqu'aux environs du 60è jour de la vie postnatale (Fig. XVII).

Ainsi, comme pour le cerveau de Rat, la néosynthèse des monophosphoinositides au cours du développement cérébral du cerveau de Poulet, suit le même rythme que celui des phosphatidyl-cholines, éthanolamines et sérines, alors que dans le cas des phosphatidyl-inositols phosphate et des phosphatidyl-inositols diphosphate on observe un parallélisme avec les plasmalogènes et les sphingomyélines.

f) Discussion.

L'étude du rythme de la néosynthèse des divers phospholipides du cerveau de Poulet entre le 7è jour de la vie embryonnaire et l'âge adulte, permet donc de classer les divers phosphatides en deux groupes (Tableau XXI). Le premier groupe renferme les phosphatidyl-cholines, les phosphatidyl-éthanolamines, les phosphatidyl-sérines et les monophosphoinositides, tandis que les plasmalogènes, les éther-phosphatides à éthanolamine, les cardiolipides, les sphingomyélines et les polyphosphoinositides forment le deuxième groupe. Les variations du rythme de la néosynthèse des phosphatides de chaque groupe permet de distinguer dans le développement biochimique du cerveau de Poulet cinq séquences (Tableau XXI):

TABLEAU XXI

VALEURS DES PENTES D'ACCROISSEMENT DE LA TENEUR EN PHOSPHOLIPIDES DU CERVEAU DE POULET AU COURS DE SON DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE ET POST-NATAL.

A/ Phospholipides du premier groupe.

Périodes	Vie embryonnaire		Eclosion	Vie post-natale	
	7-15 j	15-19 j		1-30 j	30-60 j
Phosphatidyl-cholines	1,15	1,15	6,00	1,56	0,10
Phosphatidyl-éthanolamines	1,00	1,00	5,00	1,30	0,20
Phosphatidyl-sérines	0,97	0,97	4,70	1,40	0,30
Phosphatidyl-inositols	1,07	1,07	5,00	1,66	0,12
Moyennes	1,05	1,05	5,20	1,48	0,18

B/ Phospholipides du deuxième groupe.

Périodes	Vie embryonnaire		Eclosion	Vie post-natale	
	7-15 j	15-19 j		1-30 j	30-60 j
Plasmalogènes à choline	0,25	1,29	1,29	1,29	1,29
Plasmalogènes à éthanolamine	0,23	1,27	1,27	1,27	1,27
Plasmalogènes à sérine	0,35	1,02	1,02	1,02	1,02
Ether phosphatides à éthanolamine	0,25	1,30	1,30	1,30	1,30
Cardiolipides	0,25	1,18	1,18	1,18	1,18
Sphingomyélines	0,25	1,28	1,28	1,28	1,28
Phosphatidyl Inositols phosphate	0,25	1,20	1,20	1,20	1,20
Phosphatidyl Inositols diphosphate	0,23	1,24	1,24	1,24	1,24
Moyennes	0,26	1,22	1,22	1,22	1,22

- La première s'étend jusqu'au 15è jour de la vie embryonnaire. Durant celle-ci les phosphatides du premier groupe s'accroissent selon une pente de l'ordre de 1,05, alors que la pente d'accroissement des composés du deuxième groupe reste faible, de l'ordre de 0,26 (Tableau XX).

- La deuxième séquence se situe entre le 15è et le 19è jour de la vie embryonnaire. Au cours de celle-ci la synthèse des phosphatides du premier groupe suit la même pente que dans la première séquence. On assiste par contre, à une augmentation notable de la pente d'accroissement des lipides du deuxième groupe qui se stabilise autour de 1,22, donc légèrement supérieure à celle des composés du premier groupe.

- La troisième période débute au 19è jour de la vie embryonnaire et s'arrête au premier jour de la vie post-natale; elle correspond à la période d'éclosion. Durant cette courte période, on note une augmentation considérable de la synthèse des phosphatides du premier groupe, la pente d'accroissement étant de l'ordre de 5,20 est environ cinq fois plus élevé que durant les séquences précédentes. Par contre, la synthèse des composés du deuxième groupe suit la même pente que celle apparue au 15è jour de la vie embryonnaire.

- La quatrième étape se situe entre le premier et le 30è jour de la vie post-natale. Le rythme de la néosynthèse des phospholipides du premier groupe se ralentit et suit une pente de l'ordre de 1,48. L'accroissement de ces composés devient de ce fait sensiblement parallèle à celle des phosphatides du deu-

xième groupe qui suit toujours la même pente que celle apparue au 15è jour de la vie embryonnaire.

- La cinquième période enfin, se situe au-delà du 30è jour de la vie post-natale. Elle est caractérisée par la fin de la néosynthèse des phosphatides du premier groupe selon une pente très faible de l'ordre de 0,18, alors que l'accroissement des composés du deuxième groupe reste très intense et suit la même pente que celle des trois étapes précédentes.

Il existe donc certaines similitudes entre le rythme de la néosynthèse des phospholipides du cerveau de Rat durant la vie post-natale et de celui de Poulet pendant la période allant du 7è jour de la vie embryonnaire à l'âge adulte. En effet, dans chaque cas on peut classer les divers phospholipides en deux mêmes groupes suivant leur rythme d'accumulation au cours de la croissance cérébrale. Par ailleurs, l'évolution des phospholipides du cerveau permet de distinguer dans les deux cas, trois périodes fondamentales:

- La première se situe avant le 15è jour de la vie embryonnaire chez le Poulet et avant le 10è jour de la vie post-natale chez le Rat, date où débute la myélinisation. Au cours de cette période, la néosynthèse des phosphatides du premier groupe est très active, tandis que celle des composés du deuxième groupe reste faible.

- La deuxième période se situe entre le 15è jour de la vie embryonnaire et le 30è jour de la vie post-natale chez le Poulet et le 10è et le 30è jour de la vie post-natale chez le

Rat; elle correspond à la myélinisation intense. Durant cette étape, l'accroissement des phosphatides du deuxième groupe augmente de façon très notable. Leur pente devient parallèle à celle des représentants du premier groupe. L'éclosion se situe chez le Poulet dans cette période et est caractérisée par des phénomènes biochimiques particuliers. En effet, au cours de cette séquence, le cerveau subit de brusques variations dans le rythme de la néosynthèse des phosphatidyl-cholines, éthanolamines, sérines et inositols. On observe parallèlement une forte diminution de la teneur en ATP et en CTP du tissu nerveux (220) et des modifications importantes des activités enzymatiques du métabolisme de l'acétylcholine (29). Il semble donc qu'au moment de l'éclosion le cerveau de Poulet soit soumis à des phénomènes d'induction et de dépression enzymatiques en relation avec les changements du mode de vie de l'animal. On observe des phénomènes semblables aux environs du 15è jour de la vie post-natale chez le Rat (144a) répondant à un changement du comportement du petit Rat qui commence à explorer activement son environnement, comme c'est le cas du Poulet après l'éclosion.

- Enfin, la troisième période qui s'étend au-delà du 30è jour de la vie post-natale chez le Poulet et le Rat est caractérisée par le ralentissement de la synthèse des phospholipides du premier groupe, tandis que la néoformation de ceux du deuxième groupe reste toujours intense. Il en ressort que dans le cerveau de Poulet, comme dans celui du Rat, la néosynthèse des phospholipides du premier groupe est élevée avant et pendant

la première période de la myélinisation, tandis que celle des composés du deuxième groupe, faible avant la myélinisation, devient très intense durant celle-ci.

C) Signification des variations intervenant dans la biosynthèse des divers phospholipides au cours de l'ontogénèse des cerveaux de Rat et de Poulet.

Les lipides étant essentiellement des constituants des membranes, l'ensemble de nos données sur l'évolution des phospholipides au cours du développement cérébral reflète la néosynthèse des formations membranaires. Le parallélisme entre la néosynthèse des phospholipides du deuxième groupe et la myélinisation nous incitent à penser que les plasmalogènes, les éther-phosphatides à éthanolamine, les sphingomyélines, les cardiolipides et les polyphosphoinositides sont localisés essentiellement au niveau des gaines de myéline. Une telle hypothèse avait été formulée par BRANTE (23) pour les plasmalogènes et les éther-dérivés. Par ailleurs, étudiant la répartition des plasmalogènes dans la substance grise et la substance blanche, STAMMLER et coll. (207), WEBSTER (224), CHRISTL (34), SHELTAWY et DAWSON (189), FREYSZ, BIETH et MANDEL (82), O'BRIEN (171) aboutissent à des conclusions analogues. Il en est de même pour les sphingomyélines et les polyphosphoinositides qui sont également plus abondants dans la substance blanche (28, 82, 113, 146, 199). Ainsi l'étude de la distribution régionale des constituants lipidiques confirme les conclusions qui résultent de la confrontation de l'observation morphologique de la myélinisation et de l'évolution des divers

phospholipides. En ce qui concerne les phospholipides du premier groupe (phosphatidyl-cholines, phosphatidyl-éthanolamines, phosphatidyl-sérines et phosphatidyl-inositols) dont la synthèse est déjà très importante avant la myélinisation, ils entreraient essentiellement dans la composition des structures membranaires, telles que les membranes des mitochondries et le reticulum endoplasmique. Cette hypothèse est étayée par les études sur la répartition de ces composés dans diverses zones du cerveau (82, 113, 146, 171, 199, 202).

Cependant, des travaux plus récents sur la répartition des phospholipides dans les fractions subcellulaires (65, 66, 125, 126, 168, 198, 204) et cellulaires (46, 83), ont montré que les phosphatides du deuxième groupe ne sont pas localisés exclusivement dans les gaines de myéline, mais que les mitochondries et les microsomes en contiennent un taux très important. De plus, ce sont les mitochondries qui contiennent le plus de cardiolipides (65, 125, 145). Par ailleurs, les gaines de myéline, comme les mitochondries et le Reticulum endoplasmique, renferment un taux important de phosphatides du premier groupe et les phosphatidyl-cholines représentent les composés quantitativement les plus importants au niveau des membranes. Enfin, PILZ et coll. (174) et NORTON et coll. (166) étudiant la composition chimique des gaines de myéline, constatent que la répartition des divers phospholipides est similaire à celle de la substance blanche. Ils en concluent que la matière non myélinique de la substance blanche doit avoir une composition lipidique analogue à celle des gaines myéliniques.

Il ressort de ces données que chaque type de membranes contient tous les phospholipides, mais à des taux variables suivant la membrane prise en considération. Ainsi, les phosphatides du deuxième groupe ne sont pas exclusivement des phospholipides myéliniques, mais également des constituants d'autres membranes cellulaires et leur augmentation au cours de la croissance cérébrale serait le signe biochimique,non seulement des phénomènes de myélinisation, mais aussi de la formation d'autres membranes. Il nous semble de ce fait que sur le plan phospholipidique la néoformation de toutes les membranes se réalise en deux étapes. Au cours de la première, on assisterait à la mise en place des phospholipides du premier groupe qui formeraient une matrice protomembranaire. Durant la deuxième étape cette protomembrane évoluerait progressivement par l'addition des lipides du deuxième groupe et acquerrait ainsi sa structure définitive. Cette hypothèse implique que la matrice protomembranaire soit riche en phospholipides du premier groupe, donc que les membranes protomyéliniques, protomitochondriales et autres, présentent une composition phospholipidique différente des membranes définitives. L'étude de la répartition des phospholipides dans les mitochondries et les microsomes de l'embryon de Poulet et de l'adulte (125, 126), parle en faveur de cette hypothèse. De même, il ressort des travaux de DAVison et coll. (40, 46), que la répartition des divers lipides dans les fractions subcellulaires du jeune Rat est différente de celle de l'adulte. Enfin, les travaux de

ENG et NOBLE (71) et de HORROCKS (108) sur la maturation de la myéline montrent que les phosphatidyl-éthanolamines et les phosphatidyl-cholines se déposent dans ces gaines bien avant les plasmalogènes à éthanolamine et les sphingomyélines.

En conclusion, nous pensons donc que la néoformation des diverses membranes du tissu nerveux se réaliserait en deux étapes bien distinctes: la première séquence serait caractérisée par la synthèse d'une matrice protomembranaire, dont la composition phospholipidique se limiterait essentiellement, sinon exclusivement, aux lipides du premier groupe. Au cours de la deuxième séquence on assisterait à la mise en place des divers phospholipides du deuxième groupe et la protomembrane évoluerait en membrane définitive. Ici se pose le problème de la différenciation membranaire. En effet, on peut penser que la matrice protomembranaire soit commune à toutes les membranes et que durant la seconde séquence on assiste à la différenciation de la protomembrane en membrane mitochondriale, myélinique ou autres. La différenciation membranaire serait alors le résultat de l'addition des lipides du deuxième groupe qui varierait d'une membrane à l'autre. Il semble cependant que la matrice protomembranaire soit déjà un élément bien différencié étant donné que la répartition des phosphatides du premier groupe dans les diverses fractions subcellulaires du jeune animal diffère de celle de l'adulte (125, 126) et d'une fraction subcellulaire à l'autre (66, 168). Par ailleurs, les membranes étant de nature lipo-protéique,il faut également tenir compte de la composition protéique des protomembranes qui peut leur donner une certaine spécificité.

CHAPITRE III

Incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les phospholipides du cerveau de Rat.

L'étude de l'évolution des divers phospholipides au cours du développement du cerveau de Rat nous a renseigné sur le rythme d'accroissement de ces constituants au cours de la maturation de cet organe. Nous avons entrepris les recherches sur l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les phosphatides afin de préciser l'évolution de la dynamique de leur synthèse. Une telle étude peut également nous apporter indirectement de précieux renseignements concernant les activités enzymatiques intervenant dans la biosynthèse des phospholipides au cours de la croissance et en particulier durant la myélinisation. Nous avons étudié successivement la cinétique du renouvellement des divers phosphatides dans le cerveau de Rat adulte et l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans ces mêmes composés à divers âges de la vie post-natale.

A) Etude cinétique du renouvellement des divers phospholipides du cerveau de Rat adulte.

Depuis les expériences de CHANGUS, CHAIKOFF et RUBEN (32) qui ont signalé pour la première fois l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les phospholipides du cerveau, ce problème a été abordé par de nombreux auteurs dans le cas du Rat, du Chat et du Lapin "in vivo" et "in vitro". L'attention a été attirée sur le renouvellement intense des inositides (26, 28, 49, 97,

TABLEAU XXII

CINETIQUE D'INCORPORATION DU $^{32}PO_4'''$ DANS LES DIVERS PHOSPHOLIPIDES DU CERVEAU DE RAT ADULTE.

Activité spécifique en c.m./µg P

Durée	3 h.	6 h.	12 h.	24 h.	48 h.	5 j.	10 j.	20 j.	30 j.
PO_4'''	262,3 ±29,2	244,0 ±33,6	316,0 ±39,2	311,8 ±35,0	301,8 ±12,7	286,8 ±37,6	222,3 ±22,0	187,1 ±22,4	151,2 ±23,2
Phospholipides totaux	3,49 ±1,16	11,55 ±0,49	24,79 ±1,06	40,79 ±4,56	66,30 ±4,56	113,9 ±24,0	127,0 ±10,8	106,6 ±13,8	75,90 ±12,2

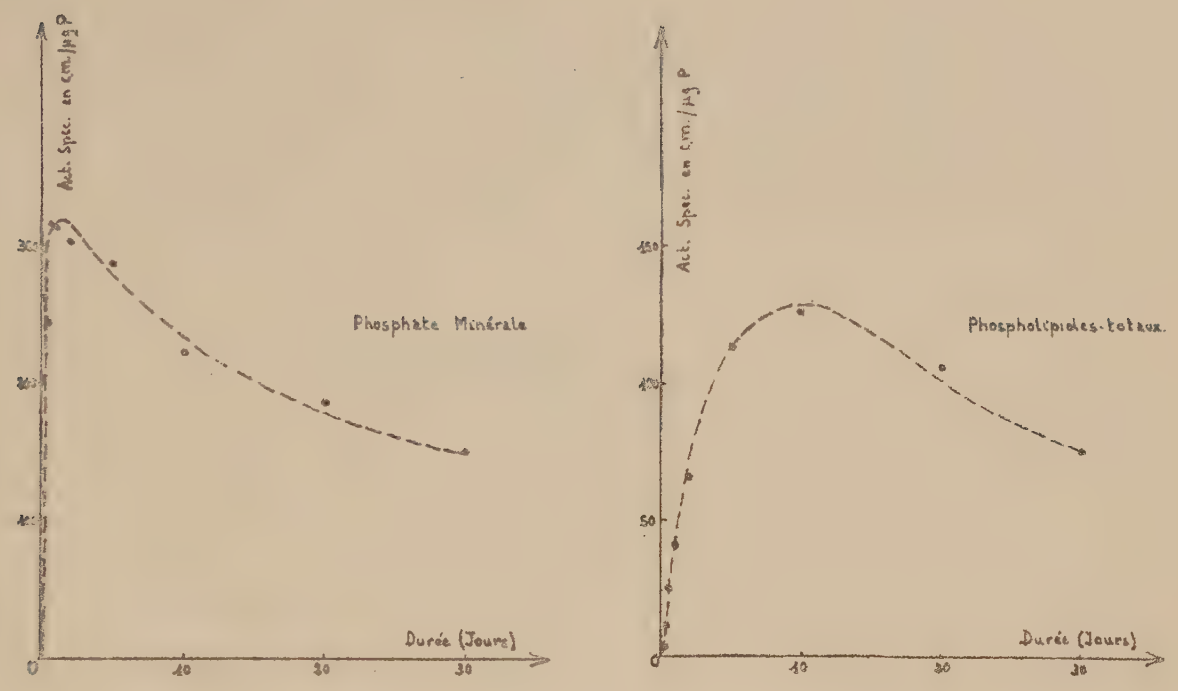


FIGURE XVIII. - Cerveau de Rat. Cinétique d'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les phospholipides du cerveau adulte. Activités spécifiques en coups/min./µg P.

101, 102, 142) et la faible activité métabolique des sphingomyélines (7, 50). Ces études se limitent en général à des périodes relativement courtes et à un seul type de phosphatide. Nos expériences ont porté sur des Rats adultes d'un poids moyen de 200 g et nous avons suivi l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les phosphatides pendant des durées s'étendant de 3 heures à 30 jours.

a) Phosphate minéral.

L'analyse de nos résultats révèle que l'accroissement de l'activité spécifique du P minéral du système nerveux central est, après injection intra-péritonéale du précurseur, relativement lent, contrairement à ce que l'on observe dans d'autres tissus, tel le foie. Le maximum n'est atteint qu'après 24 heures (Tableau XXII, Fig. XVIII). Ceci est à mettre sur le compte de l'ensemble des phénomènes désigné par le terme de "barrière hémato-cérébrale" qui a pour conséquence une pénétration lente du $^{32}PO_4'''$ dans le cerveau, comme l'ont déjà observé DZIEWIATOWSKI et BODIAN (60), DAWSON et RICHTER (47) ainsi que DAVISON et DOBBING (43). L'activité spécifique diminue ensuite également plus lentement que dans d'autres organes.

b) Phosphatidyl-cholines, phosphatidyl-éthanolamines.

L'activité spécifique moyenne du P de l'ensemble des phosphatides augmente lentement et atteint son maximum au 9è jour, puis décroît (Tableau XXII, Figure XVIII). Nous confirmons ainsi les résultats de CHANGUS et coll.(32)

TABLEAU XXIII

CINETIQUE D'INCORPORATION DU $^{32}PO_4'''$ DANS LES DIVERS PHOSPHOLIPIDES DU CERVEAU DE RAT ADULTE.

Activité spécifique en c.m./µg P

Durée	3 h.	6 h.	12 h.	24 h.	48 h.	5 j.	10 j.	20 j.	30 j.
Phosphatidyl-cholines	4,05 ±0,67	13,4 ± 3,00	33,7 ± 5,64	55,1 ± 5,22	82,7 ±10,5	133,9 ±17,3	134,5 ±17,6	91,2 ±16,9	63,8 ± 3,30
Phosphatidyl-éthanolamines	5,43 ±0,76	16,00 ± 1,38	32,2 ± 5,43	48,1 ± 7,37	88,9 ± 8,85	127,0 ±21,1	127,1 ± 16,7	93,4 ±24,3	61,9 ± 1,52

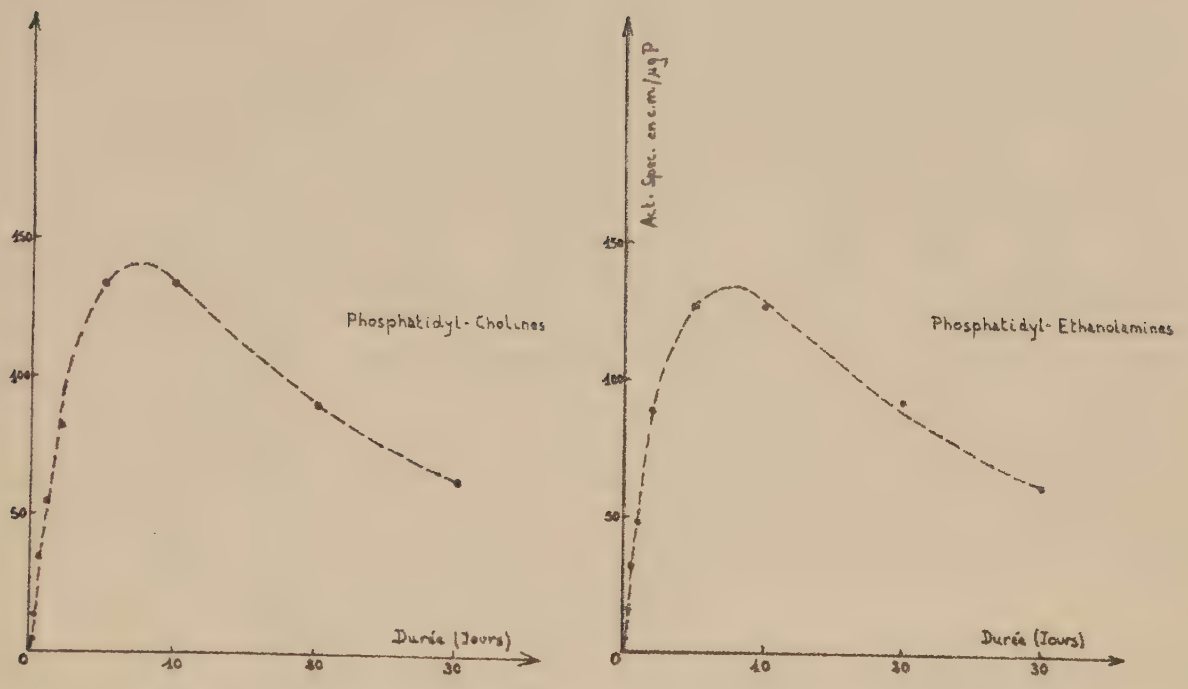


FIGURE XIX. - Cerveau de Rat. Cinétique d'incorporation du $^{32}PO_4^{---}$ dans les divers phosphatidyl-cholines et phosphatidyl-éthanolamines du cerveau adulte. Activités spécifiques en coups/min./µg P.

qui situe le maximum d'activité de l'ensemble des phosphatides vers 200 heures après l'administration du phosphate radioactif. L'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les phosphatidyl-cholines et les phosphatidyl-éthanolamines (Tableau XXIII) évolue parallèlement en augmentant jusqu'aux environs du 8è jour après l'administration du précurseur marqué (Fig. XIX). Comme ces phosphatidyl-dérivés représentent les phospholipides les plus abondants, on s'explique aisément le fait que le maximum de l'activité spécifique du P lipidique total se situe vers la même période. Après le 8è jour l'activité spécifique de ces composés diminue lentement et de façon exponentielle.

c) Phosphatidyl-inositols.

L'incorporation du phosphate radioactif dans les monophosphoinositides est de loin plus rapide que celle dans d'autres phospholipides (Tableau XXIV). L'activité spécifique de ces composés atteint son maximum dès le 4è jour après l'administration du $^{32}PO_4'''$ (Fig. XX). Elle dépasse alors nettement les valeurs des activités maximales que les autres phospholipides atteindront ultérieurement. Elle diminue ensuite rapidement jusqu'au 30è jour. Notons que ANSELL et SPANNER (6) travaillant dans des conditions analogues, trouvent des résultats similaires. WAGNER, LISSAU, HÖLZL et HÖRHAMMER (222) dont les expériences se limitent à 32 heures, n'ont pu observer le maximum d'incorporation dans ces composés.

TABLEAU XXIV

INCORPORATION DU $^{32}PO_4'''$ DANS LES DIVERS PHOSPHOLIPIDES DU CERVEAU DE RAT ADULTE.

Activité spécifique en c.m./µg P

Durée	3 h.	6 h.	12 h.	24 h.	48 h.	5 j.	10 j.	20 j.	30 j.
Phosphatidyl-Inositols	9,19 ± 1,28	30,2 ± 1,32	70,0 ± 4,45	114,1 ± 21,2	147,3 ± 28,8	178,0 ±18,7	119,6 ± 16,3	78,6 ± 8,83	44,7 ± 4,42
Plasmalogènes	1,42 ± 0,26	5,97 ± 0,91	11,4 ± 2,86	26,0 ± 7,40	49,7 ± 4,70	77,6 ± 12,9	88,2 ± 14,2	79,2 ± 17,1	62,8 ± 11,1

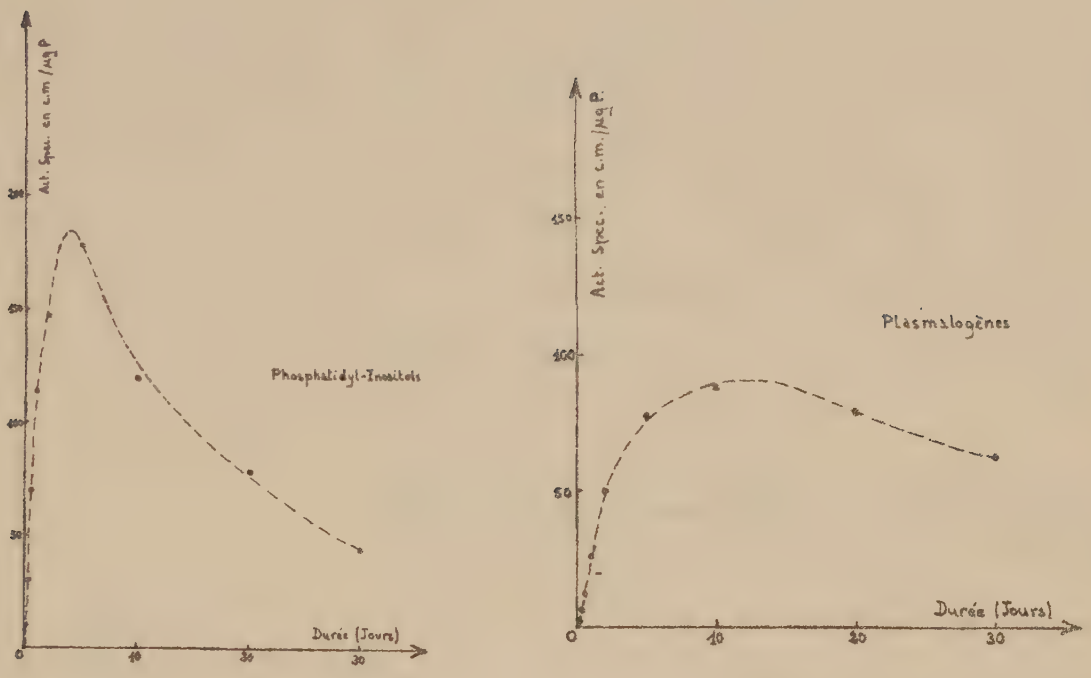


FIGURE XX. - Cerveau de Rat. Cinétique d'incorporation du $^{32}PO_4^{'''}$ dans les phosphatidyl-inositols et les plasmalogènes du cerveau adulte. Activités spécifiques en coups/min./µg P.

d) Plasmalogènes.

L'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les acétalphosphatides est bien plus faible que celle dans les inositides et les phosphatidyl-dérivés (Tableau XXIV). Leurs activités spécifiques n'atteignent le maximum qu'aux environs du 13è jour après administration du phosphate marqué (Fig. XX). Par ailleurs, elles restent sensiblement égales à la moitié de celles des phosphatidyl-dérivés pour les courtes durées jusqu'à 24 heures, puis le rapport:

$$\frac{\text{Activité spécifique des plasmalogènes}}{\text{Activité spécifique des phosphatidyl-dérivés}}$$

augmente en raison de la décroissance plus intense de l'activité de ces derniers. ANSELL et SPANNER (11) arrivent à des conclusions analogues après administration de CDP éthanolamine par voie intra-cérébrale.

e) Cardiolipides.

Les cardiolipides incorporent le $^{32}PO_4'''$ à des vitesses sensiblement similaires à celles des plasmalogènes (Tableau XXV). Faibles à des délais de 3 heures, les activités spécifiques augmentent lentement et atteignent leur maximum aux environs du 13è jour, puis diminuent (Fig. XXI).

f) Sphingomyélines

Les sphingomyélines incorporent le $^{32}PO_4'''$ encore plus lentement (Tableau XXV). Leurs activités spécifiques restent continuellement inférieures à celle des plasmalogènes et des cardiolipides. Insignifiant jusqu'à des délais de 3 heures,

TABLEAU XXV

INCORPORATION DU $^{32}PO_4'''$ DANS LES DIVERS PHOSPHOLIPIDES DU CERVEAU DE RAT ADULTE.

Activité spécifique en c.m./µg P

Durée	3 h.	6 h.	12 h.	24 h.	48 h.	5 j.	10 j.	20 j.	30 j.
Cardiolipides	2,00 ±0,50	7,4 ±2,00	13,0 ±3,20	27,8 ±4,50	40,5 ±11,0	57,5 ±5,5	67,8 ±5,3	71,0 ±15,2	56,2 ±8,2
Sphingomyélines	-	1,59 ±0,11	5,04 ±1,78	8,69 ±1,80	17,3 ±1,80	43,4 ±9,54	63,6 ±7,03	61,8 ±4,17	51,2 ±6,41

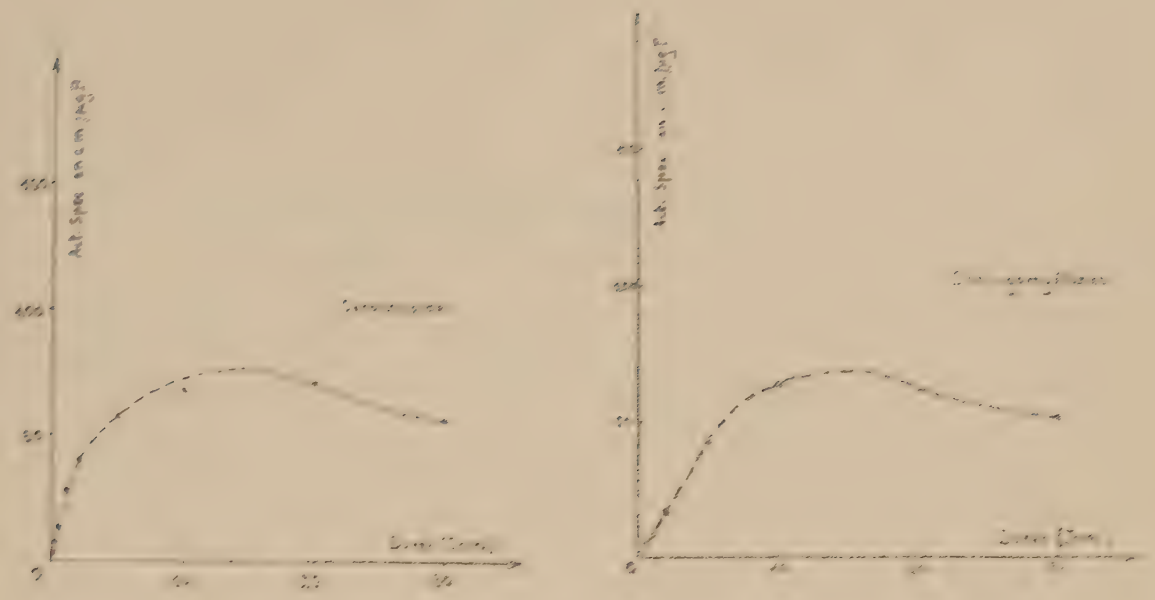


FIGURE XXI. - Cerveau de Rat. Cinétique d'incorporation de $^{32}PO_4^{---}$ dans les cardiolipides et les sphingomyélines du cerveau adulte. Activités spécifiques en coups/min./mg P.

l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ devient notable à partir de 6 heures, augmente très lentement et n'atteint son maximum qu'aux environs du 15è jour après l'injection (Fig. XXI). De tous les phospholipides étudiés, les sphingomyélines accusent donc le renouvellement le plus faible, comme l'ont déjà rapporté d'autres auteurs (7, 50).

g) Détermination des demi-vies.

La durée de nos expériences nous a permis d'atteindre la phase descendante de l'activité spécifique de tous les phospholipides étudiés et de déterminer ainsi la demi-vie de chaque composé, c'est-à-dire le temps au bout duquel la moitié des phospholipides radioactif a disparu du tissu. Cette détermination est simplifiée par le fait que la courbe de décroissance de l'activité spécifique des phosphatides est une fonction exponentielle (233), la décroissance logarithmique sera ainsi linéaire et permettra de déduire aisément la demi-vie. Dans la Figure XXIa nous donnons à titre d'exemple la détermination de la demi-vie des phosphatidyl-inositols et des phosphatidyl-cholines. Ce mode de détermination de la demi-vie ne donne évidemment qu'une valeur approximative, car compte tenu de l'activité spécifique du P minéral encore présent dans le cerveau, on obtiendra une limite supérieure de la demi-vie dont la limite inférieure est relativement peu éloignée, étant donné que l'activité spécifique du $^{32}PO_4'''$ entre le 10è et le 30è jour est faible et varie peu. Ce calcul restera cependant significatif lorsqu'on compare le

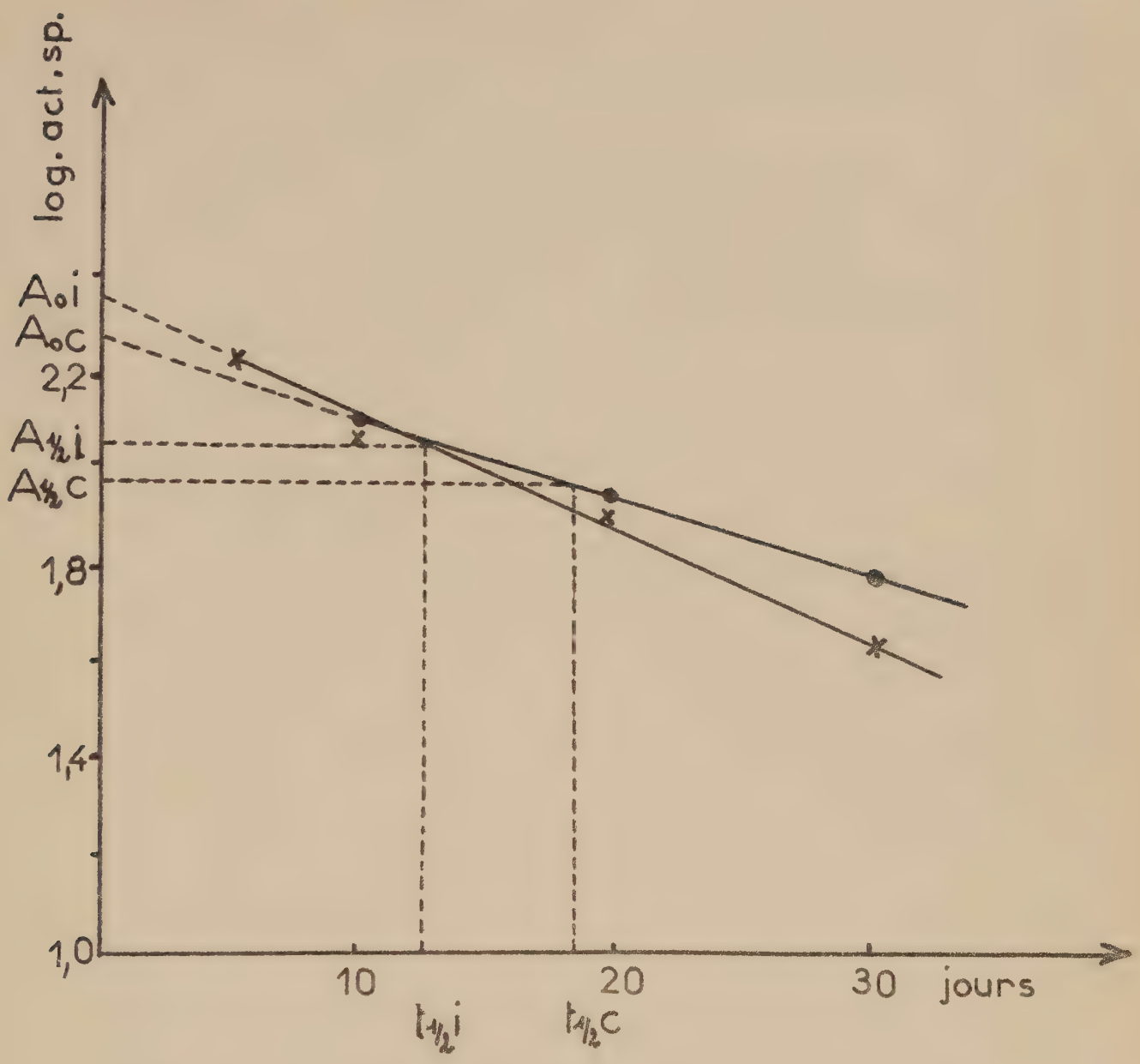


FIGURE XXIa. - Détermination des demi-vies (t1/2) des phosphatidyl-inositols (i x———x) et des phosphatidyl-cholines (c o———o) du cerveau de Rat adulte.

renouvellement des divers phospholipides d'un même tissu entre eux. Il ressort de nos résultats que dans le cerveau de Rat la demi-vie est de:

- 12,5 jours pour les phosphatidyl-inositols
- 18,5 jours pour les phosphatidyl-cholines
- 19,5 jours pour les phosphatidyl-éthanolamines
- 30 jours pour les plasmalogènes
- 32 jours pour les cardiolipides
- 40 jours pour les sphingomyélines.

h) Discussion.

Le renouvellement des divers phospholipides du cerveau de Rat adulte oscille dans des limites très larges, allant du simple au triple. La cause est évidemment à rechercher dans leur rôle biologique et leur localisation intra-cellulaire. Les phosphatidyl-cholines, les phosphatidyl-éthanolamines et les monophosphoinositides, soit les composés qui entrent dans le premier groupe défini ci-dessus, présentent le renouvellement le plus intense. Ces résultats parlent en faveur d'un rôle dynamique au niveau des structures cellulaires. Notons que les phosphatides constituent une partie intégrante de certains enzymes des mitochondries (22, 74, 75). Ainsi, la β hydroxybutyrate deshydrogenase requiert de façon spécifique des phosphatidyl-cholines (197) et le cytochrome C perd son activité une fois séparé des phosphatidyl-éthanolamines auxquels il se trouve combiné (180). Enfin, le renouvellement intense des phosphatidyl-inositols parle en faveur de l'hypothèse selon laquelle ces composés interviendraient dans les

échanges ioniques au niveau de la membrane (54, 102, 98, 102), dans le fonctionnement des mitochondries (216, 217) et lors de la transmission synaptique (127).

Le métabolisme peu intense des plasmalogènes des cardiolipides et des sphingomyélines suggère un rôle plastique de ceux-ci, ou du moins une localisation dans des structures cellulaires relativement stables. Ces trois types de phosphatides font partie des composés du deuxième groupe. Il semble donc que les phospholipides du deuxième groupe entrent dans des structures membranaires relativement stables. Nos données s'accordent avec les résultats de DAVISON et DOBBING (44, 45) qui constatent que l'activité spécifique des phospholipides totaux du cerveau de jeune Rat diminue jusqu'à 100 jours après administration du précurseur marqué puis reste constante. Il existe donc une fraction lipidique métaboliquement inerte. Ces observations rejoignent celles de TORVIK et SIDMANN (212) qui constatent qu'après administration de précurseurs marqués à des souris âgées de 5 à 22 jours, il persiste chez l'adulte encore de la radioactivité dans les gaines de myéline et le neuropile, alors que les corps cellulaires en sont dépourvus. AUGUST, DAVSION et WILLIAMS (13) ainsi que HARTH, BORKOVSKI, MARDELL et MANDEL (95) localisent les lipides métaboliquement inertes dans une préparation de myéline. Cependant ANSELL et SPANNER (7) ont montré que les sphingomyélines de la substance grise incorporent activement le $^{32}PO_4'''$, alors que celles de la substance blanche

sont inertes. De même, MANDEL et NUSSBAUM (145) ainsi que SMITH et ENG (203, 203a) ont rapporté que le renouvellement des sphingomyélines et des plasmalogènes d'une fraction pure de myéline est très faible, contrairement à celui de ces composés dans les mitochondries et les microsomes. Il convient donc de distinguer deux fractions de sphingomyélines et de plasmalogènes: une première, métaboliquement inerte dont le renouvellement est très faible, sinon nul, et qui entrerait dans les structures membranaires stables du type gaine de myéline et une deuxième dont le renouvellement est intense et qui serait localisée dans des structures membranaires qui sont le siège de réactions biochimiques actives telles que les mitochondries. Le renouvellement que nous mesurons directement sur le cerveau total, résulterait de l'addition des deux phénomènes.

B) Etude de l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les phospholipides au cours de la croissance du cerveau de Rat.

Nous avons étudié l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les divers phosphatides du cerveau de Rat entre le 5è jour de la vie post-natale et l'âge adulte. De telles études avaient déjà été conduites par FRIES et coll. (84, 85), KOREY et ORCHEN (124), DAVSION et coll. (42) ainsi que DEBUCH (56) qui utilisaient des précurseurs marqués au ^{32}P ou au ^{14}C, mais qui ne séparaient pas les divers phospholipides. Compte tenu des résultats obtenus lors de l'étude cinétique du renouvellement des divers phosphatides, les animaux sont sacrifiés 48 heures après l'administration du phosphate marqué par voie intra-

péritonéale. L'activité spécifique de tous les phospholipides se trouve ainsi sur la partie ascendante de la courbe de renouvellement. Ce fait a été confirmé récemment chez le jeune Rat (111). Les résultats sont exprimés en "activités spécifiques relatives", obtenues en rapportant l'activité spécifique du P des divers phospholipides à celles du P minéral. Ceci permet d'éliminer les paramères relatifs au passage du précurseur marqué à travers la "barrière hémato-cérébrale" et fournit des valeurs plus comparables de l'intensité du métabolisme des divers phospholipides.

a) Phosphatidyl-cholines, phosphatidyl-éthanolamines, phosphatidyl-sérines.

L'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les phosphatidyl-cholines, les phosphatidyl-éthanolamines et les phosphatidyl-sérines au cours du développement cécébral se révèle être très intense chez le jeune animal. Chez le Rat de 7 jours, on note des activités spécifiques relatives de 0,44 pour les phosphatidyl-cholines, respectivement de 0,40 et de 0,38 pour les phosphatidyl-éthanolamines et les phosphatidyl-sérines (Tableau XXVI). Les activités spécifiques relatives restent du même ordre de grandeur jusqu'aux environs du 15è jour de la vie post-natale, puis diminuent (Fig. XXII). Cette diminution régulière s'étend jusqu'au 30è jour. A partir de cet âge, l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ atteint sa valeur minimale et reste constante tout au long de la dernière phase du développement cérébral. Durant cette dernière période, les activités spécifiques relatives se situent autour de 0,30 pour les

TABLEAU XXVI

ACTIVITES SPECIFIQUES RELATIVES DU P DES DIVERS PHOSPHOLIPIDES DU CERVEAU DE RAT AU COURS DE LA CROISSANCE

Age en jours	Poids du cerveau g	A.S. PO_4 cm/µgP	A.S.R. phosphatidyl-cholines	A.S.R. phosphatidyl-éthanolamines	A.S.R. phosphatidyl-sérines
7	0,603	402	-	-	0,36
8	0,641	519	0,44	0,40	0,33
8	0,687	446	0,44	0,40	0,36
10	0,780	420	0,46	0,41	0,33
10	0,791	425	0,40	0,41	0,30
10	0,810	600	0,46	0,39	0,39
12	0,880	387	0,40	0,42	-
12	0,945	405	0,49	0,38	0,37
13	0,965	333	0,44	0,41	-
14	0,993	339	0,46	0,41	0,37
14	1,022	248	0,43	0,42	0,36
14	1,028	345	0,40	0,40	0,28
15	1,040	234	0,40	0,41	-
15	1,060	340	0,42	0,39	-
16	1,110	305	0,44	0,41	-
18	1,130	309	0,37	0,42	-
18	1,160	351	0,29	0,39	0,21

Age en jours	Poids du cerveau g	A.S. PO_4 cm/µgP	A.S.R. phosphatidyl-cholines	A.S.R. phosphatidyl-éthanolamines	A.S.R. phosphatidyl-sérines
19	1,19	211	0,32	0,37	0,28
19	1,19	165	0,30	0,37	-
20	1,21	156	0,36	0,28	0,25
20	1,24	159	0,34	0,35	0,37
24	1,26	240	0,27	0,34	0,33
24	1,29	149	0,295	0,31	0,25
26	1,32	211	0,30	0,28	0,27
30	1,38	171	0,32	0,26	0,25
30	1,41	243	0,33	0,305	0,24
35	1,44	114	0,31	0,27	-
35	1,46	218	0,34	0,31	0,24
42	1,55	440	0,31	0,29	0,14
42	1,62	152	0,29	0,28	0,12
Adulte	1,69	204	0,32	0,30	0,11
Adulte	1,70	270	0,33	0,31	0,13
Adulte	1,80	180	0,32	0,29	0,14

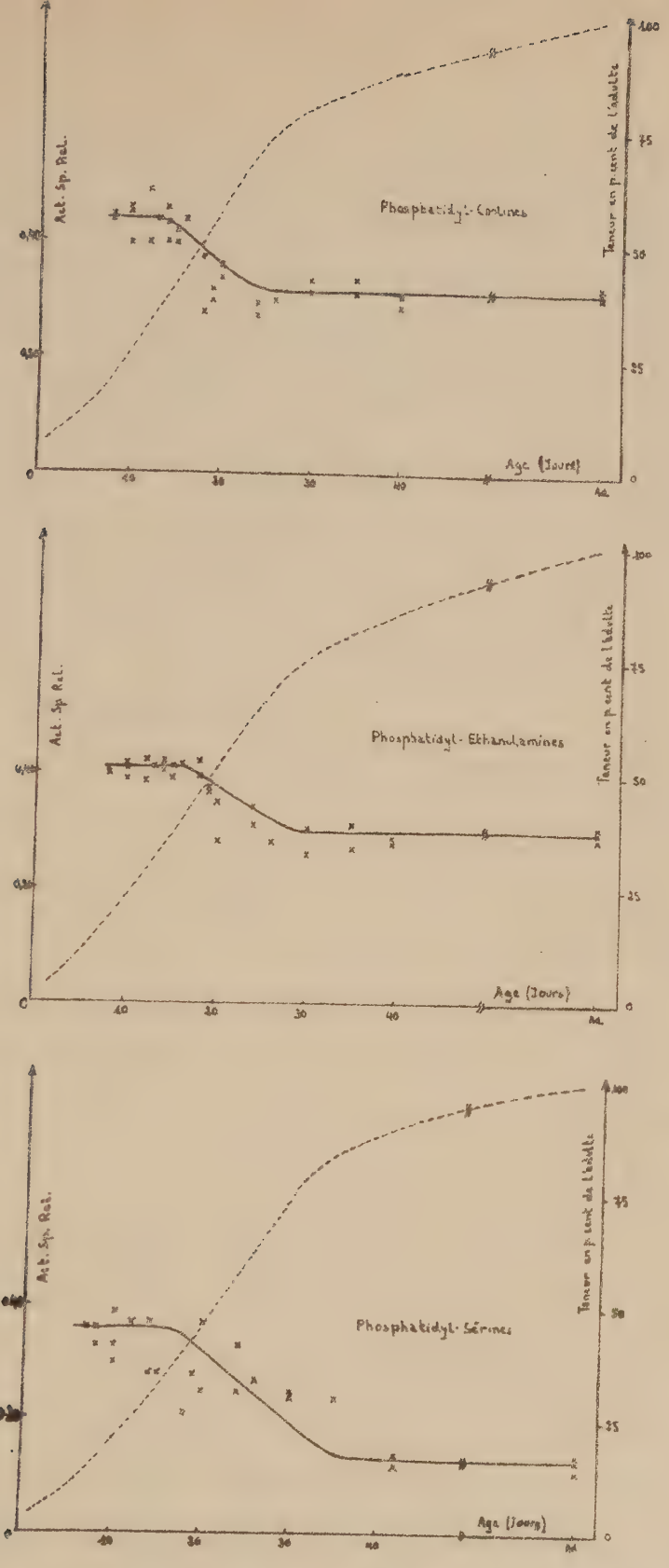


FIGURE XXII. - Cerveau de Rat. Incorporation du $^{32}PO_4^{III}$ dans les divers phosphatidyl-dérivés du cerveau au cours de sa croissance. Résultats exprimés en activités spécifiques relatives. x——x activités spécifiques relatives des divers phosphatides; ------ évolution du taux des divers phosphatides.

phosphatidyl-cholines, de 0,29 pour les phosphatidyl-éthanolamines et de 0,14 pour les phosphatidyl-sérines. Rappelons que le 30è jour de la vie post-natale correspond au ralentissement de l'accroissement de ces composés dans le tissu nerveux (Fig. XXII). Il ressort donc de nos résultats que l'incorporation la plus intense du $^{32}PO_4'''$ dans les phosphatidyl-cholines, éthanolamines et sérines se situent avant le 15è jour de la vie post-natale, soit avant la myélinisation et durant la première période de celle-ci.

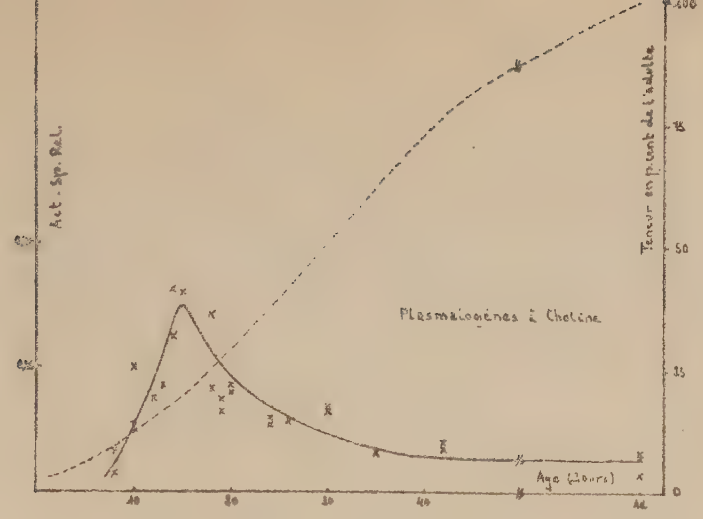
b) Plasmalogènes.

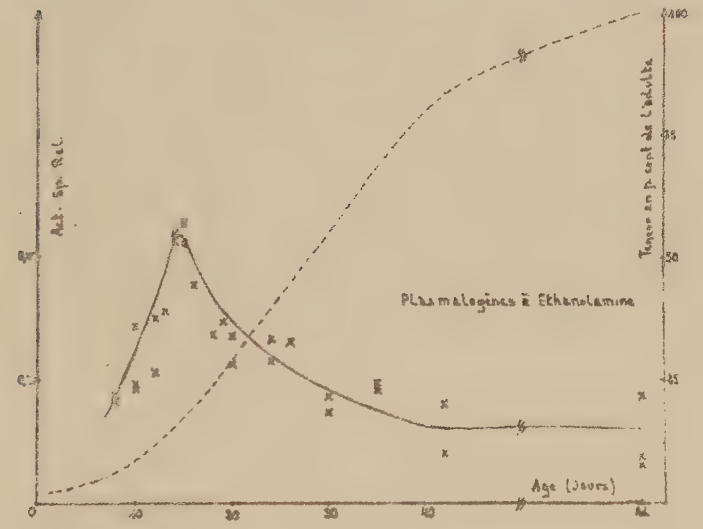
L'incorporation du phosphate marqué dans les plasmalogènes du cerveau de jeune Rat se révèle être très faible. Chez l'animal âgé de 7 jours, les activités spécifiques se situent autour de 0,06 pour les plasmalogènes à choline et ceux à sérine et autour de 0,17 pour ceux à éthanolamine (Tableau XXVII). Les activités spécifiques augmentent de façon très notable à partir du 10è jour, pour passer par un maximum à un âge compris entre 12 et 20 jours (Fig. XXIII). Cette période correspond à la phase de myélinisation la plus intense. Puis l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ diminue régulièrement jusqu'aux environs du 42è jour, âge qui correspond au ralentissement de l'accroissement de ces composés (Fig. XXIII). Les activités spécifiques relatives de l'adulte se situent autour de 0,06 pour les plasmalogènes à choline, 0,025 pour ceux à sérine et 0,12 pour ceux à éthanolamine, donc à un niveau plus bas que celles des phosphatidyl-dérivés correspondants, comme nous l'avons déjà observé lors de la cinéti-

TABLEAU XXVII

ACTIVITES SPECIFIQUES RELATIVES DU P DES DIVERS PHOSPHOLIPIDES DU CERVEAU DE RAT AU COURS DE LA CROISSANCE

Age en jours	Poids du cerveau g	A.S. PO_4 cm/µgP	A.S.R. Plasmalogènes à choline	A.S.R. Plasmalogènes à éthanolamine	A.S.R. Plasmalogènes à sérine
7	0,603	402	-	-	-
8	0,641	519	0,065	0,17	0,15
8	0,687	446	0,029	0,17	0,025
10	0,780	420	0,20	0,19	-
10	0,791	425	0,11	0,19	0,09
10	0,810	600	0,11	0,29	0,12
12	0,880	387	-	0,30	0,10
12	0,945	405	0,15	0,21	0,26
13	0,965	333	0,17	0,31	-
14	0,993	339	0,25	0,43	0,21
14	1,022	248	0,33	0,43	0,27
14	1,028	345	-	-	0,14
15	1,040	234	0,29	0,45	-
15	1,060	340	0,32	0,42	-
16	1,110	305	0,28	0,35	-
18	1,13	309	0,16	0,27	-
18	1,16	351	0,28	0,34	0,03
19	1,19	211	0,13	0,29	0,12
19	1,19	165	0,15	0,31	-
20	1,21	156	0,17	0,22	0,03
20	1,24	159	0,16	0,27	0,10
24	1,26	240	0,11	0,26	0,14
24	1,29	149	0,11	0,23	0,13
26	1,32	211	0,11	0,26	0,14
30	1,38	171	0,13	0,17	0,19
30	1,41	249	0,13	0,14	0,016
35	1,44	114	0,063	0,18	-
35	1,46	248	-	0,19	0,15
42	1,55	440	0,080	0,16	0,040
42	1,62	152	0,072	0,080	0,025
Adulte	1,69	204	0,064	0,061	0,020
Adulte	1,70	270	0,028	0,175	0,026
Adulte	1,80	180	0,064	0,070	0,014





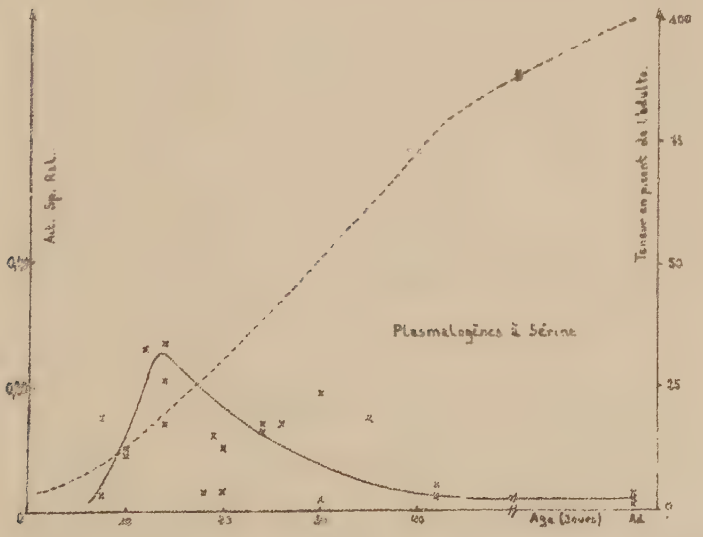


FIGURE XXIII. - Cerveau de Rat. Incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les divers plasmalogènes du cerveau au cours de la croissance Résultats exprimés en activités spécifiques relatives.

x——x activité spécifique relatives des divers phosphatide

- - - - évolution du taux des divers phosphatides.

que du renouvellement de ces composés dans le cerveau dé Rat adulte. Signalons que Mc MURRAY (161, 162), étudiant l'incorporation de divers précurseurs marqués dans les phosphatides de coupes de cerveau in vitro, constate que les phospholipides alcali-stables (plasmalogènes) présentent une incorporation maximale chez les Rats âgés de 20 jours. Par ailleurs, ANSELL et METCALFE (10) étudiant la néosynthèse des phospholipides à partir du CDP éthanolamine, observent comme nous, une synthèse bien plus élevée des plasmalogènes du cerveau chez le Rat de 23 jours que chez celui de 6 jours, contrairement à celle des phosphatidyl-dérivés qui ne subit pas de changement notable durant cette période. KOREY et ORCHEN (124) ainsi que DEBUCH (56) signalent également une forte incorporation de l'acétate et du palmitate dans les chaînes aldéhydiques du cerveau de Rat de 15 jours. IVANOVA et coll. (111) arrivent à des conclusions analogues en suivant l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans ces composés du cerveau de Rat de 13 jours et de l'adulte. N'ayant pas étudié des sujets plus jeunes, ces auteurs n'ont pu mettre en évidence la faible synthèse de ces composés avant le 10è jour de la vie postnatale.

Il ressort donc de nos essais, que l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les plasmalogènes, faible avant le 10è jour, devient très intense à partir de cet âge, c'est-à-dire lorsque débute la myélinisation et passe par un maximum aux environs du 15è jour, période où cette myélinisation est la

plus intense. Ces résultats sont en bon accord avec les données de l'analyse quantitative, qui montre un accroissement particulièrement intense de ces phosphatides à partir du 10è jour (Fig. XXIII).

c) Sphingomyélines.

L'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les sphingomyélines au cours du développement cérébral suit le même rythme que pour les plasmalogènes (Tableau XXVIII). Faible avant le 10è jour où l'on note une activité spécifique relative d'environ 0,08, la synthèse de ces composés augmente de façon très notable lors de la myélinisation (Fig. XXIV). Elle se révèle être maximum aux environs du 15è jour, puis diminue jusqu'au 42è jour. Ces résultats confirment les observations de ANSELL et SPANNER (7) qui ont noté une synthèse des sphingomyélines bien plus intense chez le Rat de 15 jours que chez l'adulte. Par ailleurs, MANUKYAN et coll. (147) observent comme nous, que l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les sphingomyélines est maximale entre le 10è et le 20è jour. Ces données reflètent également le rythme d'accumulation de ces composés au cours de la croissance comme dans le cas des plasmalogènes (Fig. XXIV).

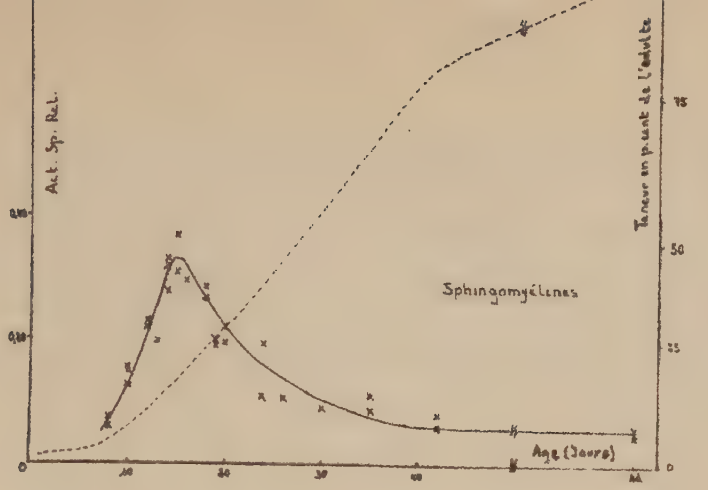
d) Cardiolipides.

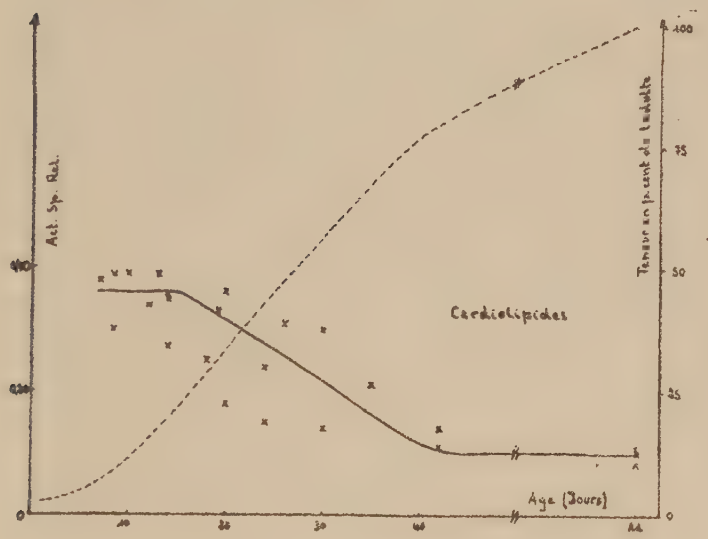
L'incorporation du phosphate marqué dans les cardiolipides suit un rythme différent de celui des plasmalogènes et des sphingomyélines, bien qu'ils appartiennent comme ces derniers au deuxième groupe des phospholipides défini plus

TABLEAU XXVIII

ACTIVITES SPECIFIQUES RELATIVES DU P DES DIVERS PHOSPHOLIPIDES DU CERVEAU DE RAT AU COURS DE LA CROISSANCE

Age en jours	Poids du cerveau g	A.S. PO_4''' cm/µgP	A.S.R. sphingo-myélines	A.S.R. cardio-lipides	A.S.R. phosphatidyl-inositols
7	0,603	402	-	0,38	-
8	0,641	519	0,075	0,39	0,40
8	0,687	446	0,060	0,30	0,30
10	0,780	420	0,125	-	0,37
10	0,791	425	0,15	-	0,35
10	0,810	600	0,153	0,39	0,48
12	0,880	387	0,22	0,34	0,40
12	0,945	405	0,23	-	-
13	0,965	333	0,197	0,39	0,42
14	0,993	339	0,32	0,35	0,43
14	1,022	248	0,329	0,35	0,39
14	1,028	345	0,28	0,27	0,41
15	1,040	234	0,31	-	-
16	1,060	340	0,37	?	0,45
16	1,110	305	0,295	-	0,34
18	1,130	309	0,267	-	-
18	0,160	351	0,286	0,25	0,40
19	1,19	211	0,191	-	0,67
19	1,19	165	0,192	0,33	-
20	1,21	156	0,22	0,18	0,64
20	1,24	159	0,195	0,36	0,46
24	1,26	240	0,193	0,24	0,55
24	1,29	149	0,108	0,15	0,44
26	1,32	211	0,106	0,31	-
30	1,38	171	0,090	0,14	0,60
30	1,41	243	0,090	0,30	-
35	1,44	114	0,088	-	-
35	1,46	218	0,11	0,21	0,46
42	1,55	440	0,080	0,11-0,055	0,59
42	1,62	152	0,061	0,14	0,63
Adulte	1,69	204	0,050	0,10	0,58
Adulte	1,70	270	0,060	0,100	0,59
Adulte	1,80	180	0,052	0,082	0,63





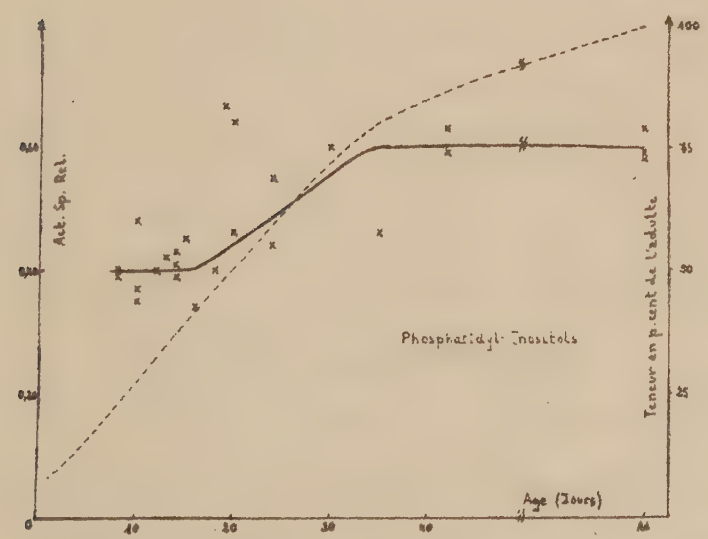


FIGURE XXIV. - Cerveau de Rat. Incorporation du $^{32}PO_4^{III}$ dans les sphingomyélines, cardiolipides et phosphatidyl-inositols du cerveau au cours de la croissance. Résultats exprimés en activités spécifiques relatives. x——x activité spécifique des divers phosphatides; ------- évolution du taux des divers phosphatides.

haut. En effet, leur synthèse est déjà très intense avant le 10è jour, comme le montrent les activités spécifiques relatives qui se situent autour de 0,38 entre le 7è et le 15è jour (Tableau XXVIII). Les activités spécifiques sont du même ordre de grandeur que celles des phosphatidyl-cholines, éthanolamines et sérines. Comme pour ces composés, l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les cardiolipides diminue à partir du 15è jour (Fig. XXIV), mais la diminution de leurs activités spécifiques s'étend sur une période bien plus longue et n'atteint sa valeur minimale qu'aux environs du 42è jour comme dans le cas des plasmalogènes et des sphingomyélines. Ces résultats étaient prévisibles, puisque l'accroissement quantitatif des cardiolipides se poursuit régulièrement jusqu'aux environs du 42è jour (Fig. XXIV). A cet âge les activités spécifiques relatives se stabilisent aux environs de 0,10 et sont du même ordre de grandeur que celles des plasmalogènes et des sphingomyélines. Les activités spécifiques élevées des cardiolipides chez le jeune animal, parlent en faveur d'un renouvellement intense de ceux-ci, étant donné que leur accumulation reste faible durant cette période (Fig. XXIV).

e) Phosphatidyl-inositols.

Les résultats de l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les phosphatidyl-inositols sont représentés dans le tableau XXVIII et la figure XXIV. On note que les activités spécifiques relatives de ces composés se situent autour de 0,40 chez le jeune animal, activité du même ordre de grandeur que

celles des phosphatidyl-dérivés. A partir du 15è jour, l'incorporation du précurseur augmente jusqu'aux environs du 30è jour pour se stabiliser autour de 0,60 après cet âge, qui correspond au ralentissement de l'accumulation de ce composé dans le cerveau (Fig. XXIV). Contrairement à ce que nous avons observé pour tous les phospholipides, on trouve donc que l'incorporation la plus intense du $^{32}PO_4'''$ dans les monophosphoinositides a lieu dans le cerveau de Rat adulte.

f) Discussion.

Les premières études sur le métabolisme des phosphatides du cerveau au cours de sa croissance ont été menées par FRIES et coll. (84, 85) qui ont mesuré la radioactivité de l'ensemble des phosphatides après injection de phosphate marqué. L'incorporation était la plus intense chez le jeune animal et diminuait jusqu'à l'âge de un mois. Cependant, ces auteurs n'ont pas tenu compte de la perméabilité du cerveau aux ions phosphates qui est plus élevée chez le jeune animal (14, 51). L'expression de nos résultats en activités spécifiques relatives élimine ce paramère et permet de ne prendre en considération que le PO_4''' qui a réellement pénétré dans le cerveau. Il ne faut cependant pas perdre de vue que l'activité spécifique de chaque phosphatide aux diverses étapes du développement du cerveau résulte de la somme du renouvellement des phosphatides existants et des composés néosynthétisés qui s'y ajoutent. D'autre part, on ne saurait ignorer qu'une fraction des divers phosphatides est localisée préfé-

rentiellement dans des structures membranaires relativement stables du type gaines de myéline. Dans ce cas, l'influence des phosphatides néosynthétisés dans les valeurs des activités spécifiques se trouve considérablement atténuée. Il faut donc tenir compte pour l'interprétation de nos résultats, à la fois de l'accroissement des phosphatides durant la croissance et de la localisation subcellulaire de ces composés.

De nos expériences, il ressort que les activités spécifiques relatives des divers phosphatides, exception faite pour les monophosphoinositides, diminuent à partir du 15è jour de la vie post-natale; cette diminution est bien plus accusée pour les plasmalogènes, les sphingomyélines et les cardiolipides que pour les phosphatidyl-dérivés. En effet, les activités spécifiques relatives chez l'adulte représentent pour les phosphatidyl-cholines et éthanolamines, environ 70 p. 100 et pour les phosphatidyl-sérines environ 39 p. 100 des valeurs trouvées à 15 jours contre 20 p. 100, 28 p. 100, 12 p. 100, 24 p. 100 et 28 p. 100, respectivement pour les plasmalogènes à choline, les plasmalogènes à éthanolamine, les plasmalogènes à sérine, les sphingomyélines et les cardiolipides. Cette diminution , bien plus importante des activités spécifiques des phosphatides du deuxième groupe, présente un argument supplémentaire en faveur d'une localisation préférentielle de ces phosphatides dans des structures membranaires stables chez le sujet adulte, alors que les phospholipides du premier groupe entreraient essentiellement dans des formations

membranaires à métabolisme élevé. Par ailleurs, la faible incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les plasmalogènes et les sphingomyélines avant la myélinisation et son augmentation durant celle-ci, indiquent que leur synthèse est étroitement associée au processus de myélinisation. Ceci n'exclut évidemment nullement la participation de ces composés à la structure et au métabolisme de fractions subcellulaires autres que la myéline.

A l'opposé, les cardiolipides présentent un renouvellement intense chez le jeune animal, tandis que leur accumulation reste faible. Il semble donc qu'au cours de la période s'étendant jusqu'au 15è jour, les cardiolipides participent activement au métabolisme cellulaire. La diminution importante des activités spécifiques après cette date ne permet pas de conclure à une perte de leur rôle dynamique au niveau cellulaire, mais serait la conséquence de l'accumulation de ces composés dans des structures à renouvellement lent. Il en résulte qu'une partie des plasmalogènes et des sphingomyélines se distingue nettement des cardiolipides par leur localisation et leur activité métabolique, bien que leur accroissement au cours de la croissance du cerveau soit parallèle.

Le renouvellement des phosphatidyl-inositols, contrairement à celui de tous les autres phospholipides, augmente au cours de la croissance cérébrale. Cet accroissement de la synthèse des phosphatidyl-inositols débute aux alentours du

15è jour qui est un tournant dans l'évolution du système nerveux du Rat. En effet, cette période correspond à l'arrêt de la division cellulaire (Cf. Fig. VIII). A la même époque on observe des modifications importantes de la consommation d'oxygène (143) et les premiers potentiels d'actions (38). L'accroissement du métabolisme des monophosphoinositides, à une période où le cerveau devient fonctionnel, parle en faveur de l'hypothèse d'un rôle actif de ces composés dans le métabolisme cellulaire et peut-être la transmission synaptique (127).

Signalons cependant, que les phosphatidyl-inositols sont les précurseurs directs des phosphatidyl-inositols phosphate et des phosphatidyl-inositols diphosphate (27, 36, 117, 118). Or, les études quantitatives de l'accumulation de ces composés nous ont montré que les polyphosphoinositides ne se synthétisent activement qu'au moment de la myélinisation (Cf. Fig. XII). Cet accroissement de la néosynthèse des polyphosphoinositides à partir du 15è jour, peut expliquer pour une part évidemment, une synthèse plus intense de précurseurs que réflète effectivement l'accroissement de l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les phosphatidyl-inositols à partir de cette date. Cependant, le renouvellement intense des monophosphoinositides peut être également relié à un rôle qui leur est propre, étant donné leur taux relativement élevé qui n'est pas habituel pour des constituants qui ne sont que des précurseurs.

En conclusion, l'ensemble des résultats sur l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les divers phosphatides du cerveau de Rat adulte et au cours de la croissance, confirme les données de l'analyse quantitative qui nous a permis de classer les divers phospholipides en deux groupes. Il apparaît également que les phospholipides du premier groupe, présentant un renouvellement intense, seraient localisés dans des structures membranaires ayant un renouvellement intense et participeraient à certains métabolismes cellulaires, surtout dans le cas des phosphatidyl-inositols. En ce qui concerne les phospholipides du deuxième groupe, il convient de distinguer deux fractions: une première métaboliquement inerte dont le renouvellement est très faible et qui entrerait dans l'architecture des structures membranaires stables, du type gaine de myéline et une deuxième, à renouvellement plus intense et qui participerait activement à certains métabolismes cellulaires. Les cardiolipides se présentent comme des composés particuliers dans ce groupe et semblent jouer un rôle actif dans le cerveau du jeune animal.

Nous n'avons pas étudié le renouvellement des polyphosphoinositides qui présentent des fonctions monoester phosphoriques pouvant s'échanger avec d'autres ions phosphates sans qu'il y ait pour autant renouvellement de la molécule. Aussi l'ensemble des conclusions sur le métabolisme des phosphatides ne s'applique pas à ces composés qui semblent jouer un rôle particulier au niveau du tissu nerveux grâce à ces phosphates monoestérifiés (25a, 69a).

CHAPITRE IV

Etude des phosphatides du cerveau à l'échelle cellulaire.

Le cerveau se présente comme un tissu hétérogène, tant sur le plan morphologique que fonctionnel. Il est essentiellement composé de deux types de cellules: les neurones et les cellules gliales. Bien que les cellules d'un même type présentent de grandes variations de masse, de forme et de fonction, on peut admettre que l'ensemble des neurones possède une spécificité chimique et biochimique qui lui est propre et qui diffère de celle des cellules gliales. Aussi est-il intéressant de connaître la répartition et le métabolisme des divers phospholipides dans les deux types cellulaires. Par ailleurs, l'étude des phosphatides au niveau cellulaire nous permettra, dans certaines limites, d'établir des correlations entre le métabolisme lipidique de chaque type cellulaire et leur activité fonctionnelle. Nous avons étudié successivement la composition chimique et le renouvellement des divers phospholipides des neurones et des cellules gliales.

Les études neurochimiques des lipides au niveau cellulaire n'ont été abordées que très récemment par KOREY (123), ROOTS et JOHNSTON (115, 184), Le BARON (132) ainsi que par DAVISON et coll. (46). Ces auteurs ne rapportent cependant que des résultats fragmentaires qui sont surtout d'ordre qualitatif.

A) Etude comparée de la composition chimique des neurones et des cellules gliales du cortex cérébral de Rat.

Les études quantitatives rapportées dans le tableau XXIX nous montrent une nette différence entre la composition chimique moyenne d'un neurone et d'une cellule gliale du cortex cérébral. Le poids sec moyen d'une cellule gliale est environ 3,5 fois supérieur à celui d'un neurone,alors que la quantité moyenne de P ADN,similaire dans les deux types de cellules, est égale à celle d'un noyau diploïde,valeur déjà rapportée par SATAKE et ABE (193) dans le cas des neurones. Les neurones ont un taux de P ARN plus élevé que les cellules gliales (1,371 pg contre 1,002 pg).Par contre, pour les protéines la répartition est inverse: dans les cellules gliales on trouve 2,8 fois plus de protéines. Chaque type de cellules se différencie surtout par sa teneur en lipides, phospholipides et cholestérol. Ainsi, le taux de ces composés est respectivement 5,8 fois et 9,3 fois plus élevé dans les cellules gliales que dans les neurones (Tableau XXIX).Notons que ROSE (185, 186) indique comme poids sec moyen d'un neurone 2300 pg,valeur environ 10 fois supérieure à celle rapportée par nous.Cette différence proviendrait d'après cet auteur, d'une perte en protéines occasionnée lors du traitement du cortex par le mélange glycérol-acétone-eau. Cependant,cette explication ne peut être retenue,car la quantité de P lipidique total par mg de protéines dans nos préparations est de 20,8 µg pour les cellules gliales et de 10,5 µg pour les

TABLEAU XXIX

COMPOSITION CHIMIQUE DES NEURONES ET CELLULES GLIALES ISOLES DU CORTEX CEREBRAL DE RAT

Résultats exprimés en pg* par cellule

	Neurones	Cellules gliales
Poids sec	254,4 ± 11,0	903,2 ± 77,0
P DNA	0,625 ± 0,056	0,636 ± 0,029
P ARN	1,371 ± 0,14	1,002 ± 0,048
N protéique	23,11 ± 0,80	64,20 ± 3,40
Lipides totaux	50,56 ± 2,22	294,0 ±16,0
Cholestérol	5,04 ± 0,22	46,76 ± 2,06
P lipidique total	1,546 ± 0,085	8,504 ± 0,20

* pg = 10^{-12} g

neurones. Or, dans le cas des hémisphères cérébraux étudiés directement sans séparation préalable des cellules, le taux de P. lipidique se situe autour de 19,8 µg par mg de protéines, c'est-à-dire très proche de celui trouvé pour les cellules gliales qui sont 5 fois plus nombreuses que les neurones (167). Ces résultats sont en faveur d'un maintien de l'intégrité des constituants cellulaires au cours de la préparation des cellules telle que nous la pratiquons.

Il se pose ici le problème de la validité d'expression des résultats lorsqu'on les exprime par rapport à une cellule. En effet, dans les préparations cellulaires obtenues par ultracentrifugation différentielle, il est difficile de préciser le taux de contamination, car toutes les cellules présentant un noyau sont prises en considération. En rapportant les résultats à une cellule, il est évident que la présence de débris cytoplasmiques va augmenter les valeurs réelles, tandis que les cellules dont le cytoplasme a été partiellement éliminé vont diminuer ces valeurs. Par ailleurs, les cellules nerveuses présentant de nombreuses expansions, il faut également tenir compte du nombre de ces prolongements encore présents après l'isolement. Or, dans nos fractions gliales, le nombre d'expansions est bien plus important que dans les neurones. Les résultats rapportés à une cellule sont donc fonction de nombreux paramètres quasiment impossibles à déterminer. Aussi nous semble-t-il plus correct de rapporter nos résultats par gramme de poids sec. Dans ces conditions, nous

diminuons considérablement les erreurs dues au comptage et aux contaminations par des débris cellulaires.

Nous avons vu que les teneurs en protéines et en lipides par cellule, sont toujours plus élevées dans les cellules gliales. Ces différences ne sont pas uniquement le reflet de leur aspect morphologique, mais également de leur composition chimique. En effet, si on rapporte les résultats au poids sec (Tableau XXX), on note que le taux d'azote protéique est de 9 p. 100 dans les neurones et seulement de 7 p. 100 dans les cellules gliales. Les neurones accusent également une teneur plus élevée en P ARN (0,54 p. 100 contre 0,11 p. 100). Dans le cas des neurones isolés des noyaux de Deiters du cerveau de Lapin par microdissection, HYDEN (110) rapporte un taux de P ARN de 0,55 p. 100. Ces valeurs sont nettement supérieures à celles trouvées par ROSE (186) ou KOREY (123) après isolement de fractions cellulaires par ultracentrifugation différentielle. Le faible taux d'ARN rapporté par ces auteurs est sans doute à mettre sur le compte de la méthode de préparation des fractions cellulaires. Ils isolent en effet des cellules métaboliquement actives, donc ne fixent pas le tissus et de ce fait une partie de l'ARN pourrait être dégradée par la ribonucléase endogène. La teneur plus élevée en ARN des neurones est évidemment due à la présence des corps de Nissl qui sont composés de lipo-ribonucléo-protéines et dont les cellules gliales sont dépourvues (109). Inversement, le taux de lipides et de P lipidique est plus élevé dans les cellu-

TABLEAU XXX

COMPOSITION CHIMIQUE DES NEURONES ET CELLULES GLIALES ISOLES DU CORTEX CEREBRAL DE RAT

Résultats exprimés par g de poids sec.

	Neurones	Cellules gliales
P ADN mg	2,460 ± 0,225	0,704 ± 0,032
P ARN mg	5,380 ± 0,55	1,110 ± 0,053
N protéique mg	91,00 ± 3,46	70,00 ± 3,78
Lipides totaux mg	199,00 ± 8,5	325,00 ± 17,5
Cholestérol mg	19,80 ± 0,85	51,80 ± 2,29
P lipidique total µmoles	196,00 ± 10,22	304,10 ± 7,06

les gliales: 32,5 p. 100 et 9 p. 100 contre respectivement 20 p. 100 et 6 p. 100 dans les neurones. Signalons enfin, la forte teneur en cholestérol des cellules gliales: 5,06 p. 100 contre 1,98 p. 100 pour les neurones. Il faut cependant considérer les valeurs rapportées ici comme des valeurs minimales, étant donné le traitement du tissu par le mélange glycérol-acétone-eau qui occasionne une légère perte de cholestérol. Ceci explique les différences entre les présentes valeurs et celles rapportées par DAVISON, CURZNER, BANIK, OXBERRY (46).

Il ressort donc de ces données que sur le plan structural la composition chimique des neurones diffère de celle des cellules gliales.

B) Etude comparée de la distribution des divers phospholipides dans les neurones et les cellules gliales du cortex cérébral de Rat.

a) Phosphatidyl-cholines, phosphatidyl-éthanolamines, phosphatidyl-sérines.

La distribution des divers phospholipides dans les deux types de cellules est rapportée dans le tableau XXXI. Les cellules gliales sont en moyenne 1,5 fois plus riches en phosphatidyl-cholines, phosphatidyl-éthanolamines et phosphatidyl-sérines que les neurones. Par ailleurs, dans les deux types de cellules, la teneur en phosphatidyl-cholines se révèle être la plus élevée; viennent ensuite les phosphatidyl-éthanolamines et les phosphatidyl-sérines. En exprimant la teneur de ces composés en fonction des phospholipides totaux, on note que le taux de chacun de ces phosphatides pris indi-

TABLEAU XXXI

DISTRIBUTION QUANTITATIVE DES DIVERS PHOSPHOLIPIDES DANS LES NEURONES ET LES CELLULES GLIALES ISOLES DU CORTEX CEREBRAL DE RAT

Résultats exprimés en µmoles par g de poids sec

	Neurones	Cellules gliales
Phosphatidyl-cholines	72,50 ± 7,03	113,00 ± 3,21
Phosphatidyl-éthanolamines	33,70 ± 3,92	57,90 ± 7,00
Phosphatidyl-sérines	19,20 ± 3,55	30,07 ± 1,46
Plasmalogènes à choline	3,11 ± 0,50	4,71 ± 0,24
Plasmalogènes à éthanolamine	26,30 ± 4,65	43,20 ± 1,47
Plasmalogènes à sérine	3,76 ± 0,24	5,10 ± 0,11
Cardiolipides	11,14 ± 1,01	15,70 ± 1,18
Sphingomyélines	11,06 ± 1,02	15,70 ± 0,66
Phosphotidyl-inositols	5,61 ± 0,26	9,15 ± 0,54
Ether-phosphatides à éthanolamine	2,30 ± 0,77	4,92 ± 0,66

TABLEAU XXXII

REPARTITION DES DIVERS PHOSPHOLIPIDES DANS LES NEURONES ET LES CELLULES GLIALES ISOLES DU CORTEX CEREBRAL DE RAT

Résultats exprimés en p. 100 du P lipidique total

	Neurones	Cellules gliales
Phasphatidyl-cholines	37,00	37,00
Phosphatidyl-éthanolamines	17,20	19,00
Phosphatidyl-sérines	9,80	10,10
Plasmalogènes à choline	1,60	1,60
Plasmalogènes à éthanolamine	13,60	14,20
Plasmalogènes à sérine	1,92	1,68
Cardiolipides	5,69	5,16
Sphingomyélines	5,63	5,16
Phosphatidyl-inositols	2,86	3,01
Ether-phosphatides à éthanolamine	1,17	1,61

viduellement est similaire dans les deux types cellulaires et se situe respectivement autour de 37 p. 100 pour les phosphatidyl-cholines, de 18 p. 100 pour ceux à éthanolamine et de 10 p. 100 pour ceux à sérine (Tableau XXXII).

b) Plasmalogènes.

Les deux types cellulaires renferment les trois plasmalogènes déjà décrits pour le cerveau total, c'est-à-dire ceux à choline, ceux à éthanolamine et ceux à sérine. Comme pour les phosphatidyl-dérivés, on note que la teneur en plasmalogènes des cellules gliales est environ 1,6 fois plus élevée que celle des neurones et ceci quelle que soit la base azotée (Tableau XXXI). Les plasmalogènes à éthanolamine représentent environ 80 p. 100 des plasmalogènes totaux, les deux autres composés accusant chacun un taux d'environ 10 p. 100. Enfin, le taux de chaque plasmalogène par rapport aux phospholipides totaux se révèle être similaire dans les deux types de cellules et représente en moyenne 1,6 p. 100 pour les plasmalogènes à choline, 14 p. 100 pour ceux à éthanolamine et 1,8 p. 100 pour ceux à sérine (Tableau XXXII).

c) Cardiolipides, sphingomyélines, éther-phosphatides à éthanolamine, phosphatidyl-inositols.

La teneur en cardiolipides et en sphingomyélines est similaire dans les cellules gliales et environ 1,5 fois supérieure à celle des neurones (Tableau XXXI). Le taux de ces deux composés par rapport aux phospholipides totaux se situe autour de 5,4 p. 100 et se trouve être du même ordre de grandeur dans les deux types de cellules (Tableau XXXII). Remar-

quons que les sphingomyélines longtemps considérées comme des phosphatides typiquement myéliniques au même titre que les cérébrosides et les protéolipides, entrent également pour une grande part, dans la constitution des formations membranaires des neurones et des cellules gliales et la détermination quantitative de ces composés ne peut,de ce fait, pas être considérée comme un test de la myélinisation (63). En effet, alors que dans les gaines de myéline le taux de sphingomyélines est de 8,3 p. 100, il est de 5,4 p. 100 dans les deux types cellulaires.

En ce qui concerne les phosphatidyl-inositols et les éther-phosphatides à éthanolamine , la teneur est environ 1,6 fois plus élevée dans les cellules gliales que dans les neurones (Tableau XXXI). Le taux des phosphatidyl-inositols et des éther-phosphatides à éthanolamine par rapport à l'ensemble des phosphatides est similaire dans les deux types cellulaires et se situe respectivement autour de 3,00 p. 100 pour les phosphatidyl-inositols et de 1,37 p. 100 pour les éther-phosphatides à éthanolamine (Tableau XXXII).

d) Discussion.

Il ressort donc de nos expériences, que si les neurones et les cellules gliales renferment les mêmes types de phospholipides que le cerveau total, les quantités absolues par gramme de poids sec sont toujours plus élevées au niveau des cellules gliales et ceci pour tous les phosphatides étudiés. Par ailleurs, le taux de chaque phosphatide par rapport aux phospholipides totaux, est semblable dans les deux types de

cellules. Ce fait parle en faveur d'une analogie des structures membranaires dans ces deux types cellulaires, du moins au niveau des unités phospholipidiques. Puisque la membrane est de nature lipoprotéique, il faut évidemment tenir compte de sa composition protéique avant de conclure à une similitude des structures membranaires des deux types de cellules. Enfin, si on admet une analogie structurale des membranes dans les deux types de cellules, la teneur plus élevée en phospholipides des cellules gliales, suggère une présence plus abondante de formations membranaires au niveau de ces cellules. La signification de ce dernier phénomène soulève plusieurs hypothèses. Il peut s'agir:

1) d'une densité plus grande des formations membranaires dans les cellules gliales,
2) de phénomènes dus à un nombre plus grand d'expansions dans les cellules gliales.
3) à l'existence d'un plus grand nombre d'unités phospholipidiques par unité de protéines membranaires dans les cellules gliales.

Il nous semble que les trois éventualités doivent être retenues. En effet, la structure des cellules gliales, surtout celles de petites tailles, paraît plus compacte et le nombre d'expansions y est relativement plus élevé et enfin la quantité de phospholipides par mg de protéines plus élevée (4,28 µmoles pour les cellules gliales, contre 2,15 µmoles pour les neurones). Quoiqu'il en soit, en ce qui concerne les

phosphatides, à eux seuls nos résultats suggèrent l'existence d'un "modèle membranaire phospholipidique" semblable dans les divers types de cellules du système nerveux central sans qu'il soit identique pour autant.

C) Etude de l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les phospholipides des neurones et des cellules gliales du cortex cérébral de Rat.

Nous avons étudié le renouvellement des divers phosphatides dans les deux types de cellules à l'aide du phosphate radioactif administré par voie intra-péritonéale à raison de 400 µc pour 100 g de poids corporel. Dans cette série d'expériences il nous a été impossible de déterminer l'activité spécifique des précurseurs qui diffusent dans le milieu lors de l'isolement des cellules.

a) Phospholipides totaux.

Il ressort de nos expériences que l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les phospholipides totaux est plus rapide dans les neurones que dans les cellules gliales (Tableau XXXIII). En effet, les activités spécifiques sont maximales après 4 jours dans les neurones et seulement après 7 jours dans les cellules gliales (Fig. XXV). Il apparaît donc que le métabolisme phospholipidique des neurones est plus intense que celui des cellules gliales.

b) Phosphatidyl-cholines, phosphatidyl-éthanolamines, phosphatidyl-sérines.

L'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les phosphatidyl-cholines, éthanolamines et sérines est plus intense dans les neurones que dans les cellules gliales (Tab. XXXIV). Au ni-

TABLEAU XXXIII

INCORPORATION DU $^{32}PO_4^{'''}$ DANS LES PHOSPHOLIPIDES TOTAUX DES NEURONES ET DES CELLULES GLIALES DU CORTEX CEREBRAL DE RAT ADULTE.

Activité spécifique en c.m./µg P

Durée	12 H.	24 h.	48 h.	5 jours	8 jours	10 jours	13 jours	15 jours
Neurones	75,0 ± 7,0	139 ± 7,5	166 ±12,0	160 ± 11,5	156 ± 3,2	134 ± 8,0	92,0 ±10,5	104 ± 11,2
Cellules gliales	32,0 ± 2,9	71,0 ± 8,0	121 ±14,8	129 ± 4,9	133 ± 5,1	137 ± 9,3	95,0 ±12,0	103 ± 6,0

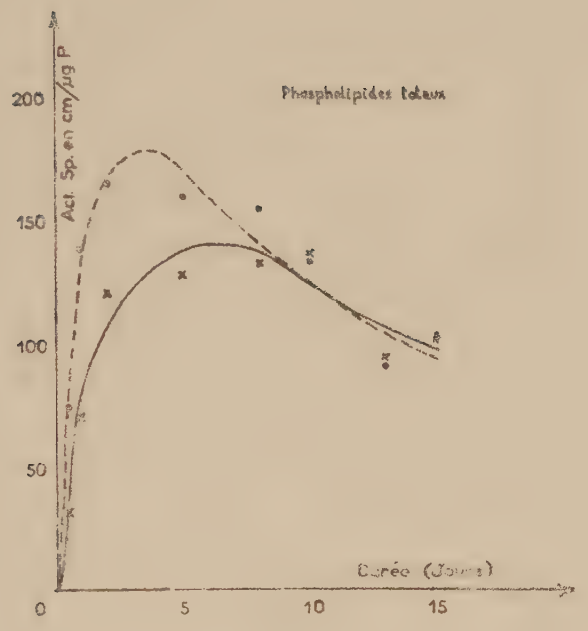


FIGURE XXV. - Cerveau de Rat. Cinétique d'incorporation du $^{32}PO_4^{III}$ dans les phospholipides totaux des neurones et des cellules gliales. Activités spécifiques en coups/min./µg P. o-------o neurones ; x———x cellules gliales.

TABLEAU XXXIV

INCORPORATION DU $^{32}PO_4'''$ DANS LES DIVERS PHOSPHOLIPIDES DES NEURONES ET CELLULES GLIALES DU CORTEX CEREBRAL DE RAT ADULTE

Activité spécifique en c.m./µg P

Durée	12 h.	24 h.	48 h.	5 jours	8 jours	10 jours	13 jours	15 jours
A/ NEURONES								
Phosphatidyl-cholines	66,2 ± 2,3	146 ±13,9	201 ±20,2	161 ± 8,0	173 ± 5,0	140 ± 7,5	105 ±14,0	100 ± 5,3
Phosphatidyl-éthanol-amines	56,0 ± 2,6	123 ±14,8	179 ±19,9	148 ± 7,8	148 ± 2,0	113 ±11,8	95,0 ±17,0	91,0 ± 2,0
Phosphatidyl-sérines	24,0 ± 2,0	89,0 ± 7,7	136 ± 5,2	121 ± 7,1	124 ± 2,0	110 ± 4,9	77,0 ±6,9	81,0 ±12,2
B/ CELLULES GLIALES								
Phosphatidyl-cholines	38,0 ± 6,1	77,0 ± 3,2	123 ± 9,9	135 ± 4,4	161 ± 4,0	143 ± 2,4	103 ±15,1	104 ± 7,4
Phosphatidyl-éthanol-amines	35,0 ± 2,0	69,0 ±12,2	122 ± 8,2	129 ± 9,0	140 ± 2,0	125 ±10,2	103 ±11,6	106 ±15,7
Phosphatidyl-sérines	15,0 ± 1,0	42,0 ± 8,7	88,0 ±11,5	105 ±24,3	110 ± 2,0	110 ± 9,4	94,0 ±12,9	92,0 ±12,0

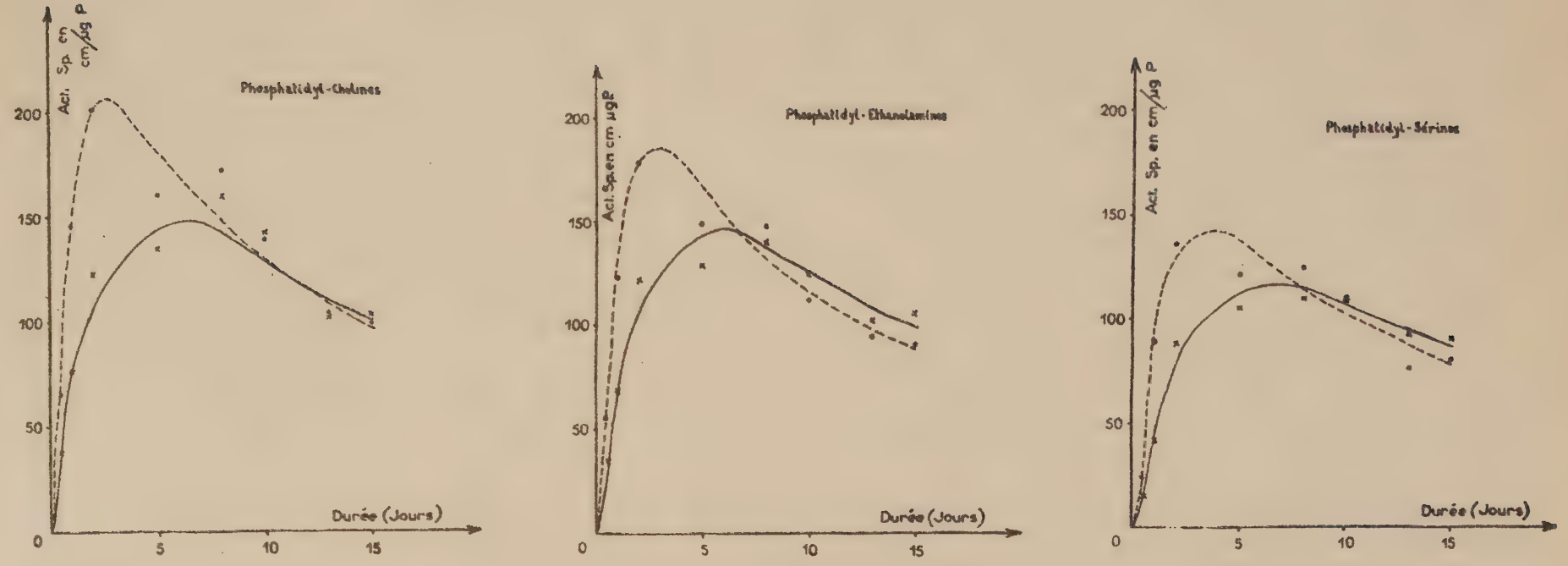


FIGURE XXVI. - Cerveau de Rat. Cinétique d'incorporation du $^{32}PO_4^{III}$ dans les divers phosphatidyl-dérivés des neurones et des cellules gliales. Activités spécifiques en coups/min./µg P.

●------● neurones ; x——x cellules gliales.

veau des neurones, l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les phosphatidyl-cholines et éthanolamines évolue parallèlement en augmentant jusqu'aux environs du 3è jour (Fig. XXVI). Les phosphatidyl-sérines par contre, se renouvellent à une vitesse plus lente et n'atteignent leur maximum d'activité qu'aux environs du 4è jour (Fig. XXVI). Dans les cellules gliales le renouvellement de ces composés donne une image analogue à celle des neurones. En effet, les phosphatidyl-cholines et éthanolamines de ces cellules incorporent le $^{32}PO_4'''$ à des vitesses similaires. Ils n'atteignent cependant leur maximum d'activité qu'aux environs de 6 jours, tandis que la maximum des activités spécifiques des phosphatidyl-sérines se situe autour du 7è jour.

La différence entre le métabolisme des phosphatidyl-dérivés, des neurones et des cellules gliales ressort mieux après la détermination de leur demi-vie qui est respectivement de l'ordre de 11,0, 11,5 et 13,0 jours pour les phosphatidyl-cholines, éthanolamines et sérines des neurones et de 14, 14,5 et 16,5 jours pour ces mêmes phosphatides dans les cellules gliales.

c) Plasmalogènes.

Comme pour les phosphatidyl-dérivés, l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les plasmalogènes est plus rapide dans les neurones que dans les cellules gliales (Tab. XXXV). Dans les deux types de cellules, les activités spécifiques des plasmalogènes à éthanolamine et à sérine sont sensiblement du même ordre de grandeur que celle des phosphatidyl-dérivés corres-

TABLEAU XXXV

INCORPORATION DU $^{32}PO_4'''$ DANS LES DIVERS PHOSPHOLIPIDES DES NEURONES ET CELLULES GLIALES DU CORTEX CEREBRAL DE RAT ADULTE

Activité spécifique en c.m./µg P

Durée	12 h.	24 h.	48 h.	5 jours	8 jours	10 jours	13 jours	15 jours
A/ NEURONES								
Plasmalogènes à choline	105 ± 6,2	322 ± 15,1	321 ±22,6	238 ± 67,5	-	101 ± 15,5	-	85,0 ± 4,5
Plasmalogènes à éthanolamine	55,0 ± 3,3	117 ± 8,0	168 ±19,9	142 ±15,8	135 ± 2,0	103 ± 14,3	67,0 ± 3,0	86,0 ± 9,3
Plasmalogènes à sérine	12,0 ± 1,0	43,0 ± 13,8	74,0 ±20,0	99,0 ±28,1	76,5 ±10,0	70,0 ± 13,1	-	50,0 ± 6,4
B/ CELLULES GLIALES								
Plasmalogènes à choline	50,0 ±10,0	99,0 ± 23,0	168 ± 15,0	135 ± 16,0	-	102 ± 11,0	-	76,0 ± 9,4
Plasmalogènes à éthanolamine	26,0 ± 4,3	65,0 ± 3,7	108 ± 5,1	120 ± 3,5	118 ± 1,0	110 ± 4,4	90,0 ±13,0	93,0 ± 9,7
Plasmalogènes à sérine	11,0 ± 2,0	35,0 ± 6,3	70,0 ± 7,3	75,0 ±17,3	87,0 ± 6,0	73,0 ± 7,6	69,0 ± 3,0	64,0 ± 4,1

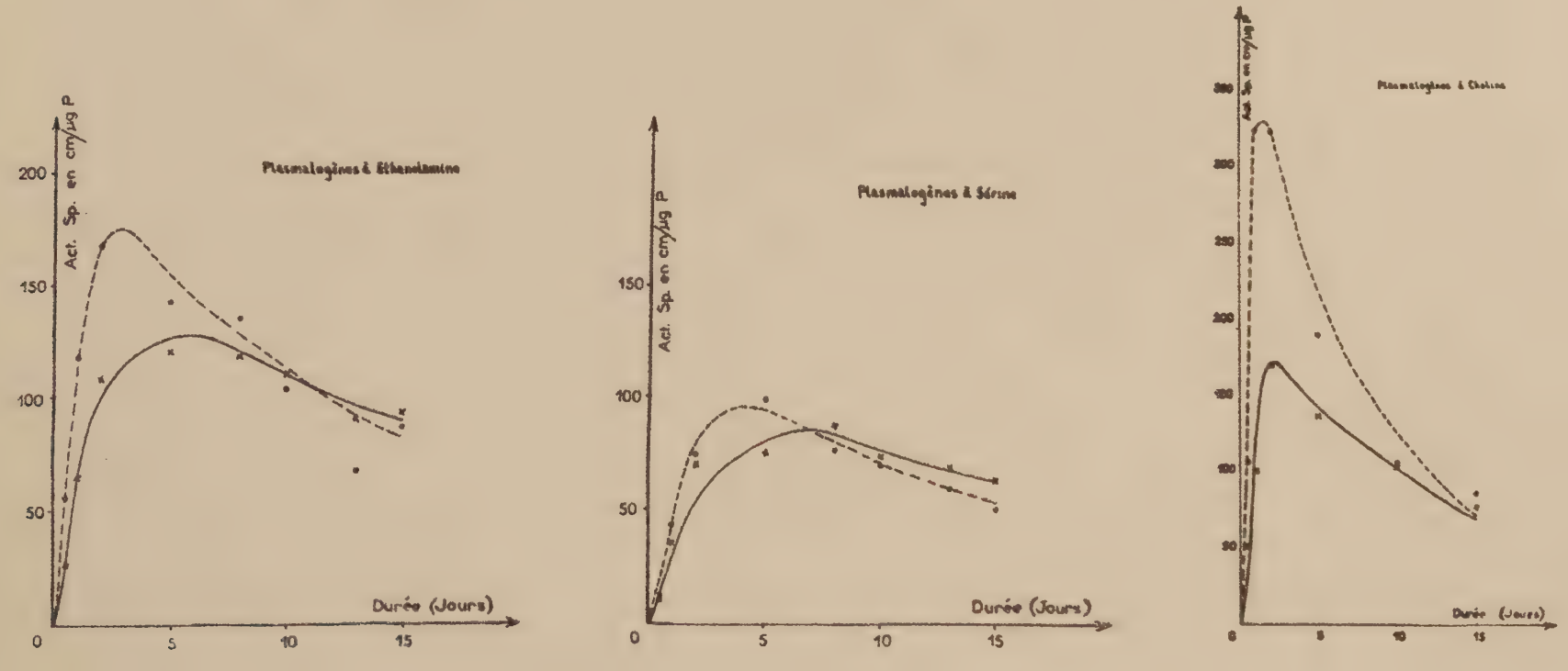


FIGURE XXVII. - Cerveau de Rat. Cinétique d'incorporation du $^{32}PO_4^{III}$ dans les divers plasmalogènes des neurones et des cellules gliales. Activités spécifiques en coups/min./µg P.

●------● neurones ; x——x cellules gliales.

pondants (Fig. XXVII). Le maximum de radioactivité se situe respectivement autour de 3 jours et 4 jours pour les plasmalogènes à éthanolamine et sérine des neurones et autour de 6,5 jours et 7 jours pour ceux des cellules gliales. Par ailleurs, la demi-vie des plasmalogènes à éthanolamine et sérine qui est respectivement de 11 jours et 13 jours au niveau des neurones et de 13 jours et 16 jours au niveau des cellules gliales, est du même ordre de grandeur que celle des phosphatidyl-dérivés correspondants.

L'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les plasmalogènes à choline se révèle être bien plus intense que dans les phosphatidyl-dérivés correspondants (Tableau XXXV). L'activité spécifique de ces composés atteint son maximum dès 36 heures après l'administration du $^{32}PO_4'''$ dans les neurones et après 48 heures dans les cellules gliales (Fig. XXVII). Elle dépasse alors nettement les valeurs des activités spécifiques maximales que les phosphatidyl-cholines correspondants atteindront ultérieurement. Ce métabolisme plus intense des plasmalogènes à choline est évidemment le reflet de la demi-vie de ces composés qui est de 6 jours dans les neurones et de 9,5 jours dans les cellules gliales, donc bien plus courte que celle des phosphatidyl-cholines.

d) Ether-phosphatides à éthanolamine.

Le renouvellement des éther-phosphatides à éthanolamine des deux types de cellules est parallèle à celui des phosphatidyl-éthanolamines et des plasmalogènes correspondants (Tableau XXXVI). Ils atteignent leur maximum d'activité après

TABLEAU XXXVI

INCORPORATION DU $^{32}PO_4'''$ DANS LES DIVERS PHOSPHOLIPIDES DES NEURONES ET CELLULES GLIALES DU CORTEX CEREBRAL DE RAT ADULTE

Activité spécifique en c.m./µg P .

Durée	12 h.	24 h.	48 h.	5 jours	8 jours	10 jours	13 jours	15 jours
A/ Neurones								
Ether-phosphatides à éthanolamine	53,0 ± 4,9	116 ± 6,0	157 ± 8,9	116 ± 2,0	136 ± 4,9	97,0 ± 1,6	90,0 ± 1,6	80,0 ±16,6
Phosphatidyl-in.sitols	205 ±47,7	291 ±39,7	281 ±13,3	188 ±34,3	170 ±11,0	137 ±14,7	-	99,0 ± 6,7
B/ Cellules gliales								
Ether phosphatides à éthanolamine	25,0 ± 4,9	61,0 ± 4,9	97,0 ± 1,0	109 ± 2,1	122 ± 2,1	110 ± 3,2	87,0 ± 4,3	92,0 ± 2,7
Phosphatidyl-inositols	188 ±27,2	205 ±29,4	216 ±35,1	155 ±17,1	140 ±10,0	130 ±12,1	86,0 ± 2,0	92,0 ± 2,0

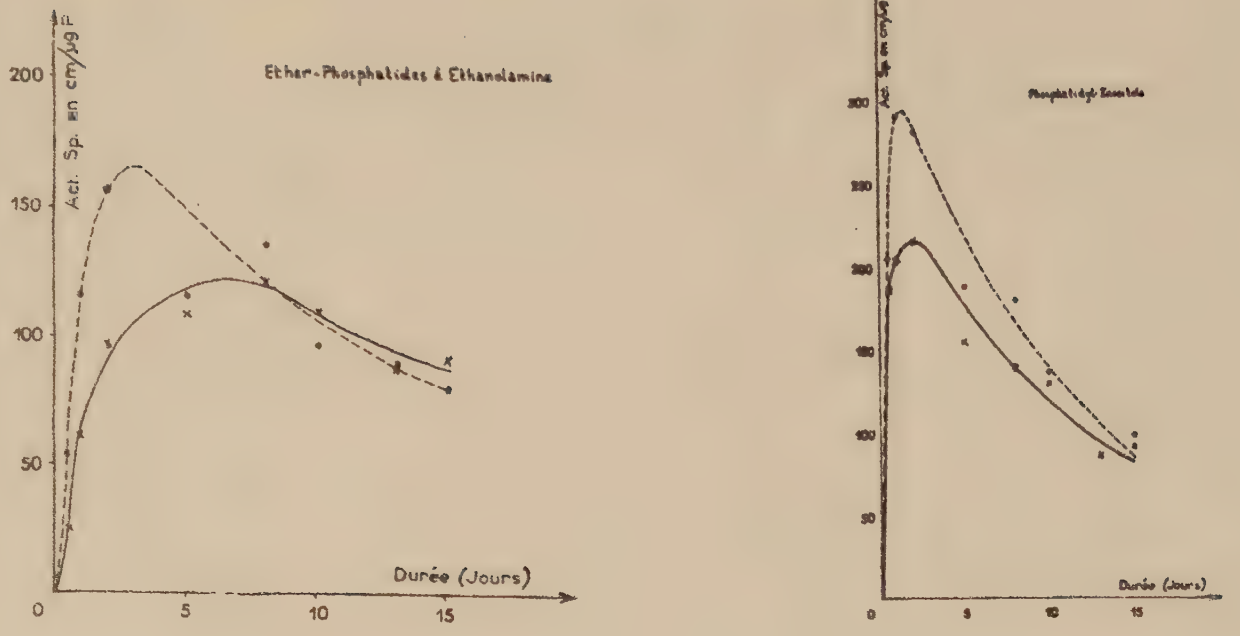


FIGURE XXVIII. - Cerveau de Rat. Cinétique d'incorporation du $^{32}PO_4^{III}$ dans les éther-phosphatides à éthanolamine et les phosphatidyl-inositols des neurones et des cellules gliales. Activités spécifiques en coups/min./µg P. o------o neurones ; x——x cellules gliales.

3 jours dans les neurones et 6,5 jours dans les cellules gliales (Fig. XXVIII). Leur demi-vie est similaire à celle des deux phosphatides à éthanolamine, soit de 11 jours dans les neurones et de 15 jours dans les cellules gliales.

e) Phosphatidyl-inositols.

L'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les phosphatidyl-inositols est, avec celle des plasmalogènes à choline, la plus intense (Tableau XXXVI). Comme pour les plasmalogènes à choline, l'activité spécifique de ces composés atteint son maximum dans les neurones dès 36 heures après administration du phosphate radioactif et après 48 heures dans les cellules gliales (Fig. XXVIII). Par ailleurs, la demi-vie de ces composés, de 7 jours dans les neurones et de 9,5 jours dans les cellules gliales, est du même ordre de grandeur que celle des plasmalogènes à choline. Les phosphatidyl-inositols présentent donc également un métabolisme plus intense dans les neurones que dans les cellules gliales.

f) Sphingomyélines.

Le renouvellement des sphingomyélines est bien plus rapide dans les neurones que dans les cellules gliales (Tableau XXXVII). En effet, au niveau des neurones, les activités spécifiques de ces composés sont semblables à celles des phosphatidyl-cholines et éthanolamines. Leur maximum d'activité se situe aux environs du 3è jour et leur demi-vie est de 11 jours comme pour les deux phosphatidyl-dérivés (Fig. XXIX). Dans les cellules gliales par contre, l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans ces composés est nettement infé-

TABLEAU XXXVII

INCORPORATION DU $^{32}PO_4'''$ DANS LES DIVERS PHOSPHOLIPIDES DES NEURONES ET CELLULES GLIALES DU CORTEX CEREBRAL DE RAT ADULTE

Activité spécifique en c.m./µg P

Durée	12 h.	24 h.	48 h.	5 jours	8 jours	10 jours	13 jours	15 jours
A/ NEURONES								
Sphingomyélines	29,0 ± 5,1	155 ±11,4	177 ± 5,2	150 ±11,9	159 ± 1,0	121 ±13,7	84,0 ± 6,7	93,0 ±14,3
Cardiolipides	20,0 ± 2,1	55,0 ± 3,2	84,0 ± 2,3	102 ± 6,5	118 ± 1,0	99,0 ± 9,4	65,0 ± 3,0	88,0 ± 6,5
B/ CELLULES GLIALES								
Sphingomyélines	13,0 ± 3,2	44,0 ± 5,1	64,0 ± 2,9	81,0 ± 5,1	-	85,0 ±16,2	75,0 ±10,0	71,0 ± 6,4
Cardiolipides	10,0 ± 3,6	23,0 ± 6,1	49,0 ± 7,4	70,0 ±10,9	79,0 ± 2,0	86,0 ±13,2	64,0 ± 1,5	73,0 ±11,6

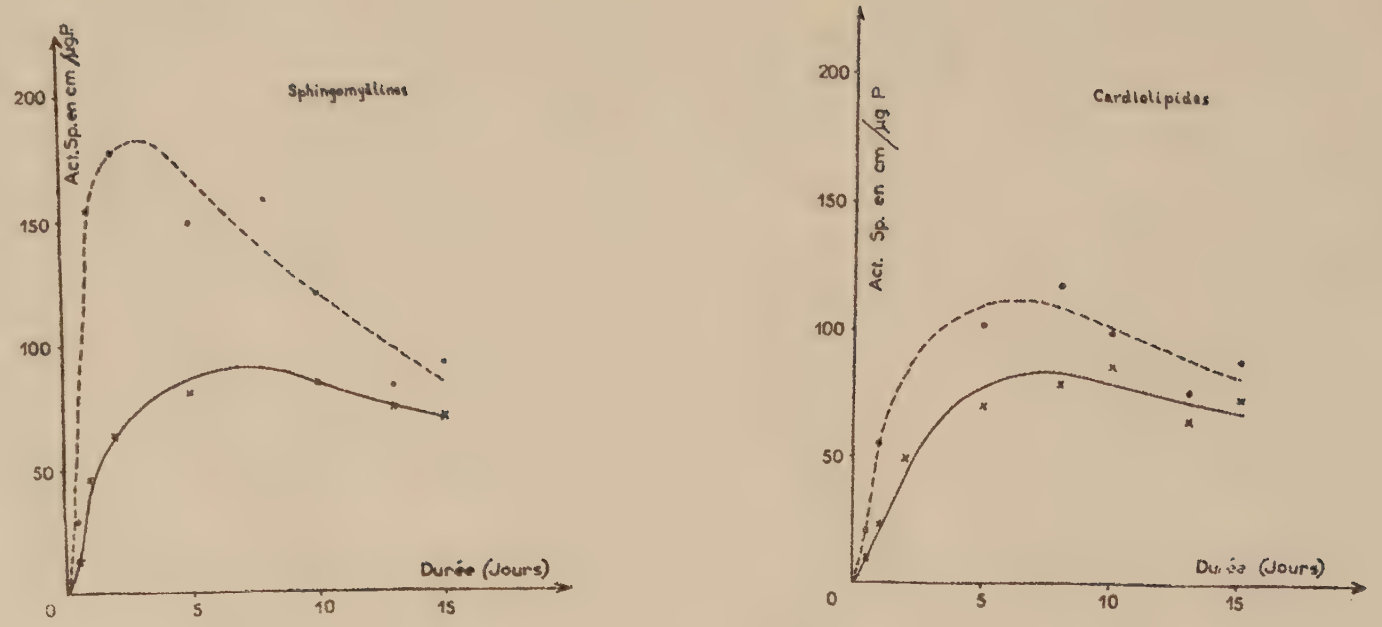


FIGURE XXIX. - Cerveau de Rat. Cinétique d'incorporation du $^{32}PO_4^{III}$ dans les sphingomyélines et les cardiolipides des neurones et des cellules gliales. Activités spécifiques en coups/min./µg P.
●-------● neurones ; x———x cellules gliales.

rieure à celle des phosphatidyl-cholines et éthanolamines (Fig. XXIX). Elles n'atteignent leurs valeurs maximales que 8 jours après l'administration du précurseur marqué. Leur demi-vie de 20 jours est bien supérieure à celle des phosphatidyl-cholines et éthanolamines. Il en résulte donc qu'au niveau des cellules gliales les sphingomyélines présentent une certaine inertie métabolique par rapport aux autres phosphatides, inertie que l'on ne retrouve pas au niveau des neurones.

g) Cardiolipides.

Dans les deux types de cellules, les cardiolipides représentent le composé qui se renouvelle le plus lentement (Tableau XXXVII). Comme pour l'ensemble des autres phosphatides, l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans ces composés est plus rapide dans les neurones où elle atteint son maximum après 6 jours, que dans les cellules gliales où le maximum n'est atteint qu'après 8 jours (Fig. XXXI). Le faible renouvellement se traduit également par des demi-vies bien plus longues que pour l'ensemble des autres phosphatides. Elles se situent autour de 18 jours dans les neurones et autour de 25 jours dans les cellules gliales.

h) Discussions

Il ressort de nos expériences que la vitesse de renouvellement des divers phospholipides des neurones est supérieure à celle des cellules gliales. Au niveau des neurones le métabolisme des phosphatidyl-inositols et des plasmalogènes à choline se révèle être le plus intense et celui des

cardiolipides le plus faible. L'ensemble des autres phosphatides présente des vitesses de renouvellement intermédiaires. Les demi-vies des phosphatidyl-cholines, des trois phosphatides à éthanolamine et des sphingomyélines sont similaires et légèrement supérieures à celles des deux phosphatides à sérines (Tableau XXXVIII). Dans les cellules gliales, le renouvellement des divers phospholipides donne une image analogue à celle des neurones excepté pour les sphingomyélines qui accusent une demi-vie nettement supérieure à celui des phosphatidyl-cholines et éthanolamines.

Le renouvellement plus intense des phosphatides des neurones pourrait être la conséquence soit d'une pénétration plus rapide des précurseurs dans les neurones, soit d'un métabolisme plus intense de ces composés au niveau de ces cellules, soit des deux phénomènes simultanément. La simple étude de l'incorporation du phosphate radioactif dans les phospholipides aux délais courts, ne permet pas de conclure à un renouvellement plus intense des phosphatides dans les neurones que dans les cellules gliales, car il peut s'agir d'une différence de pénétration du $^{32}PO_4'''$ dans les deux types de cellules. Cependant, l'évaluation des demi-vies à partir de la phase descendante de l'activité spécifique des divers phosphatides est indépendante de la vitesse de pénétration du PO_4''' dans les cellules. Or, son analyse démontre que les demi-vies des divers phosphatides des neurones sont plus courtes que celles des cellules gliales (Tableau XXXVIII).

TABLEAU XXXVIII

DUREE DE DEMI-VIE DES DIVERS PHOSPHOLIPIDES DU TISSU NERVEUX

Demi-vie exprimée en jours

	Cerveau total	Neurones	Cellules gliales
Phosphatidyl-inositols	12,5	7,0	9,5
Phosphatidyl-cholines	18,5	11,0	14,0
Phosphatidyl-éthalolamines	19,5	11,5	14,5
Phosphatidyl-sérines	-	13,0	16,5
Plasmalogènes à éthanolamine	30,0	11,0	15,0
Plasmalogènes à choline		6,0	9,5
Plasmalogènes à sérine		13,0	16,5
Ether-phosphatides à éthanolamine	-	11,0	15,0
Sphingomyélines	40,0	11,0	20,0
Cardiolipides	32,0	18,0	25,0

et par conséquent le métabolisme des phospholipides est plus intense dans les neurones que dans les cellules gliales. Par ailleurs, le faible renouvellement des sphingomyélines dans les cellules gliales, comparé au métabolisme beaucoup plus intense de ces composés dans les neurones, en apporte une preuve supplémentaire. Il apparaît donc que chaque type de cellules possède son propre métabolisme. Remarquons que VOLPE et GIUDITTA (218, 219) étudiant l'incorporation de l'acide orotique dans les deux types des cellules du cerveau de Lapin in vivo, observent également un marquage plus intense des ARN des neurones, tandis que ROSE (187) incubant des cellules in vitro note que le métabolisme des amino acides des neurones diffère de celui des cellules gliales.

D) Conclusions générales de l'étude sur l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les phospholipides du cerveau de Rat.

Il découle de l'ensemble des données sur le renouvellement des phospholipides du cerveau de Rat, que le métabolisme de ces composés est hétérogène. Dans une même cellule, les différents phosphatides se renouvellent à des vitesses différentes, comme nous venons de le voir dans les neurones et les cellules gliales. Par ailleurs, le métabolisme de chaque phosphatide est également fonction de sa localisation cellulaire, voire sub-cellulaire. Ainsi un phosphatide déterminé incorpore le $^{32}PO_4'''$ à des vitesses différentes, suivant qu'il est localisé dans les cellules gliales, dans les neurones soit dans les diverses structures subcellulaires. Tous ces paramètres rendent difficiles l'interprétation des résul-

tats. Cependant, comparant le renouvellement des phosphatides des deux types cellulaires à celui du cerveau total, il est possible de tirer quelques conclusions sur le rôle probable de ces composés dans le tissu cérébral.

L'examen du tableau XXXVIII montre que les demi-vies des sphingomyélines et des plasmalogènes des neurones comme des cellules gliales, sont bien plus courtes que celles du cerveau total. Nous confirmons ainsi la présence au niveau du tissu nerveux de sphingomyélines et de plasmalogènes à métabolisme élevé. Comme les demi-vies de ces phosphatides au niveau du tissu entier représentent la moyenne des demi-vies des diverses structures cellulaires, il doit nécessairement exister des compartiments sub-cellulaires où le métabolisme de ces composés est très faible, sinon nul. Cette hypothèse est confirmée par les études de l'incorporation de précurseurs marqués dans les diverses fractions sub-cellulaires (145, 203, 203a) où l'on constate que le métabolisme des sphingomyélines et des plasmalogènes dans les gaines de myéline se situe à un niveau très bas par rapport à celui des mitochondries et des microsomes. L'existence de deux rythmes métaboliques différents de ces composés en fonction de leur localisation parle en faveur de l'hypothèse de la dualité du rôle des sphingomyélines et des plasmalogènes au niveau du tissu nerveux, à savoir un rôle dynamique qui revient à la fraction à renouvellement intense localisée dans les corps cellulaires et un rôle statique qui échoît à la fraction à métabolisme faible située au niveau des gaines de myéline.

En ce qui concerne les phospholipides du premier groupe, on note que les différences entre les demi-vies des phosphatidyl-cholines, éthanolamines et inositols cellulaires et celles du cerveau total, sont plus faibles (Tableau XXXVIII). Ceci suggère que ces composés sont localisés essentiellement dans des structures sub-cellulaires à métabolisme intense, auquel ils participent activement. Cependant, le renouvellement plus faible de ces phospholipides dans le cerveau total nous incite à penser qu'une partie de ces composés présente également un métabolisme plus faible. Cette conclusion est étayée par les études du métabolisme phospholipidique des fractions sub-cellulaires où l'on observe un renouvellement plus lent de ces phosphatides dans les gaines de myéline que dans les mitochondries et les microsomes (145, 203, 203a). Il en résulte donc que tels les lipides du deuxième groupe, une fraction des phosphatides du premier groupe présente également un renouvellement faible au niveau des membranes métaboliquement inertes. Cependant le taux de cette fraction par rapport à la fraction à métabolisme intense est inférieure à celui du deuxième groupe. Il faut donc considérer les deux groupes de phosphatides comme un mélange de composés à métabolisme intense et de composés à renouvellement lent, les deux groupes se différenciant par le taux de la fraction métaboliquement active ou inerte constituant chaque groupe. Dans le cas des phosphatides du premier groupe, la majeure partie des composés formerait la fraction lipidique à renouvellement rapide, alors que dans celui du deuxième groupe

seule une faible proportion constituerait la fraction métaboliquement active.

Chaque type de phosphatide se présente également sur le plan structural comme un mélange hétérogène qui dépend de la composition en acides gras du phospholipide pris en considération. Cette hétérogénéité structurale rapprochée de la dualité métabolique, laisse entrevoir la possibilité que chaque fraction métabolique corresponde à un type de phosphatide dont la répartition en acide gras est spécifique. Dans ces conditions, il existerait au niveau du tissu nerveux deux pools de phospholipides dont chacun pourrait être défini par la nature des acides gras entrant dans sa composition.

Les études de la répartition des acides gras ont montré que les sphingomyélines de la substance blanche et de la myéline sont riches en acides gras à longue chaîne ($^{C}20$ à $^{C}26$), alors que celles de la substance grise renferme essentiellement des acides gras d'une longueur de chaîne de 14 à 18 atomes de carbones (112, 133, 134). En ce qui concerne les plasmalogènes, O'BRIEN (172) observe également une différence dans la composition en aldéhydes gras suivant que ces composés sont isolés à partir de la myéline ou de la substance grise. Des observations analogues ont été rapportées sur la composition en acide gras des phosphatidyl-dérivés qui varie avec la localisation sub-cellulaire (170). Ces données nous font penser qu'au niveau du tissu nerveux, la fraction phospholipidique à renouvellement lent se différen-

cie de celle à métabolisme intense par la composition en aicde gras des divers phosphatides de chaque fraction. Cette hypothèse reste à vérifier.

Par ailleurs, PORGES et SOJAK (175) ainsi que LESCH et coll. (135) observent une similitude entre la composition en acides gras des sphingomyélines du cerveau de nouveau-né et des sphingomyélines de la matière grise de l'adulte ainsi que l'absence d'acides gras à longues chaînes ($^{C}20$ à $^{C}26$). Ces études permettent d'interpréter la diminution de l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les divers phosphatides au cours de la croissance du cerveau de Rat après le 15è jour de la vie post-natale. Avant la myélinisation il y a surtout néosynthèse des phosphatides à métabolisme élevé, donc ayant une composition en acides gras voisine de celle de la substance grise chez l'adulte. Durant la myélinisation on assiste à la synthèse simultanée des phospholipides à renouvellement lent à acides gras à longue chaîne et des composés métaboliquement actifs à chaînes plus courtes. Le fait que les composés myéliniques une fois accumulés ne se renouvellent que très lentement, explique la diminution des activités spécifiques quand on considère le total de ces composés au-delà du 15è jour.

RESUME ET CONCLUSION

Nous avons étudié quelques aspects de la néosynthèse et du métabolisme des divers phospholipides du système nerveux central dans le but d'établir des corrélations entre le métabolisme et le développement biochimique de cet organe qui est parallèle à l'ontogénèse fonctionnelle.

Dans une première partie nous avons comparé la néosynthèse des divers phosphatides au cours du développement cérébral. Celui-ci pouvant varier d'une espèce animale à l'autre, nous avons suivi simultanément le rythme d'évolution des divers phosphatides des cerveaux de Rat et de Poulet afin d'établir si leur croissance suit des lois communes. Cette étude a nécessité au préalable la mise au point d'un certain nombre de techniques, entre autres celle de l'extraction quantitative des polyphosphoinositides.

Il ressort de l'ensemble des résultats que le développement des cerveaux de Rat et de Poulet est caractérisé par un accroissement de tous les phosphatides, mais le rythme de leur néosynthèse diffère et permet de les classer en deux groupes. Le premier renferme les phosphatidyl-cholines, les phosphatidyl-éthanolamines, les phosphatidyl-sérines et les phosphatidyl-inositols. Les plasmalogènes à choline, ceux à éthanolamine et ceux à sérine, les éther-phosphatides à éthanolamine, les cardiolipides, les sphingomyélines, les phosphatidyl-inositols phosphate et diphosphate forment le deuxième groupe.

Les variations du rythme de la néosynthèse de ces deux groupes de phosphatides permettent de distinguer trois périodes dans le développement biochimique des cerveaux de Rat et de Poulet.

La première se situe avant la myélinisation et est caractérisée par la néosynthèse très intense des phospholipides du premier groupe, alors que celle des composés du deuxième groupe reste faible.

La seconde étape correspond à la période de myélinisation intense. La néosynthèse des lipides du premier groupe s'y poursuit au même rythme que durant la première étape. Celle des phosphatides du deuxième groupe s'accroît de façon très notable et devient parallèle au rythme néosynthétique des représentants du premier groupe. Chez le Poulet, cette étape se subdivise en trois séquences du fait de l'éclosion qui a lieu durant cette période où l'on assiste à des phénomènes biochimiques particuliers en relation probable avec l'accroissement rapide de l'activité fonctionnelle due au changement du mode de vie de l'animal.

La troisième étape correspond à la fin de la myélinisation et est caractérisée par l'arrêt de la néosynthèse des lipides du premier groupe, alors que celle des composés du deuxième groupe reste encore très active.

Ces données confrontées avec celles de la répartition des divers lipides dans les fractions sub-cellulaires, nous font penser que la néoformation des diverses membranes se réalise en deux étapes. Au cours d'une première, on assiste-

rait à la formation d'une protomembrane qui serait constituée essentiellement, sinon exclusivement, des phosphatides du premier groupe. Durant la seconde étape, cette membrane se transformerait progressivement par l'addition des lipides du deuxième groupe et acquerrait ainsi sa structure définitive.

Dans une deuxième partie de notre travail, nous avons envisagé certains aspects du métabolisme des divers phospholipides du cerveau de Rat adulte et au cours de la croissance en étudiant l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans ces composés.

Dans un travail préliminaire, nous avons constaté que le métabolisme des phosphatides du premier groupe du cerveau de Rat adulte est bien plus intense que celui des composés du deuxième groupe. Les demi-vies des phosphatidyl-cholines, phosphatidyl-éthanolamines et phosphatidyl-inositols sont inférieures à 20 jours et celles des plasmalogènes, sphingomyélines et cardiolipides sont supérieures à 30 jours. Ceci suggère que les phospholipides du premier groupe sont localisés essentiellement dans des membranes métaboliquement actives du type mitochondrial et du reticulum endoplasmique et qu'ils participeraient activement à leur métabolisme, tandis que les composés du deuxième groupe entreraient préférentiellement dans la composition de structures membranaires à renouvellement lent du type des gaines de myéline.

Les études de l'incorporation du phosphate marqué dans les phospholipides au cours de la croissance cérébrale révèlent une diminution des activités spécifiques relatives de tous les phosphatides, exception faite pour les phosphatidyl-

inositols, à partir du 15è jour de la vie post-natale, c'est-à-dire lors de la myélinisation. Cette diminution des activités spécifiques est bien plus intense pour les phosphatides du deuxième groupe. Par ailleurs, on observe que l'incorporation du phosphate marqué dans les plasmalogènes et les sphingomyélines est faible avant la myélinisation, puis passe par un maximum au cours de la myélinisation intense, pour diminuer à partir du 15è jour. Ces données indiquent que la synthèse de ces composés est étroitement associée au processus de la myélinisation et confirment leur localisation préférentielle dans les structures à renouvellement lent. A l'opposé, les cardiolipides présentent avant les phénomènes de myélinisation des activités spécifiques élevées, du même ordre de grandeur que celles des phosphatides du premier groupe. Ceci suggère une participation active de ces composés à certains métabolismes cellulaires du jeune animal. Il semble de ce fait que les cardiolipides jouent un rôle différent de celui des sphingomyélines et des plasmalogènes au niveau du tissu nerveux, bien que leur accumulation au cours de la croissance du cerveau soit parallèle. En ce qui concerne les phosphatidyl-inositols, on note un accroissement du renouvellement de ces composés lorsque le cerveau devient fonctionnel, suggérant leur participation active au métabolisme cellulaire et en particulier lors de l'activité fonctionnelle du cerveau.

Dans une troisième partie, nous nous sommes intéressé à la répartition et au métabolisme des phospholipides à un niveau cellulaire. Cette étude a nécessité au préalable la mise au point d'une technique d'isolement de neurones et de cellules gliales en quantités suffisantes pour permettre une étude biochimique quantitative et métabolique dans des conditions satisfaisantes.

La comparaison de la composition biochimique des neurones et des cellules gliales, a révélé que les neurones sont plus **riches** en acides nucléiques et en protéines que les cellules gliales, alors que ces dernières accusent le taux le plus élevé en lipides et phospholipides. Les cellules gliales sont environ 1,6 fois plus riches en phospholipides que les neurones et ceci pour tous les phosphatides étudiés. Cependant, le taux de chaque phosphatide pris individuellement par rapport aux phospholipides totaux, est similaire dans les deux types de cellules. Ces données parlent en faveur d'une analogie des structures membranaires dans les deux types de cellules et d'une présence plus abondante des formations membranaires dans les cellules gliales.

Enfin, nous avons étudié le renouvellement des divers phosphatides dans les deux types cellulaires. Les demi-vies des divers phosphatides se révèlent être les plus courtes dans les neurones suggérant que chaque type cellulaire possède un métabolisme spécifique et que celui des neurones est plus élevé que celui des cellules gliales en relation probable avec leurs activités fonctionnelles.

Parallèlement, nous avons constaté que le renouvellement des phospholipides des corps cellulaires est bien plus intense que celui des composés du cerveau entier: ceci est particulièrement net pour les phosphatides du deuxième groupe et suggère que dans le cerveau chaque phosphatide du deuxième groupe est un mélange de deux fractions: une première à renouvellement intense, localisée dans les structures cellulaires à métabolisme élevé auquel elle participe activement, et une deuxième à renouvellement lent située au niveau de structures membranaires à métabolisme faible du type gaine de myéline. En ce qui concerne les phosphatides du premier groupe, on aboutit à des conclusions analogues, mais la proportions appartenant à la fraction métaboliquement active semble être bien plus élevée dans le cas des composés du deuxième groupe.

Notre travail, qui avait pour objet d'établir des correlations entre le métabolisme des phospholipides et l'ontogénèse révèle que:

1°) l'évolution des divers phospholipides du système nerveux au cours de la croissance s'effectue selon deux rythmes différents permettant de classer les phospholipides en deux groupes et indiquant que la formation des structures membranaires se réalise en deux étapes. Cette évolution des composés lipidiques du cerveau suit une loi générale chez les vertébrés supérieurs.

2) chaque groupe de phospholipides se subdivise en deux fractions: l'une à renouvellement intense participant acti-

vement au métabolisme cellulaire, l'autre à renouvellement lent jouant un rôle structural. La différence entre les proportions relatives des fractions métaboliquement actives et inertes explique la différence métabolique observée entre les deux groupes de phospholipides.

BIBLIOGRAPHIE

1) ADAMS C.W.M., DAVISON A.N., J. Neurochem., 1959, 4, 282.

2) ANSELL G.B., NORMAN J.M., J. Neurochem., 1956, 1, 32.

3) ANSELL G.B., NORMAN J.M., J. Neurochem., 1956, 1, 39.

4) ANSELL G.B., DOHMEN H., J. Neurochem., 1956, 1, 150.

5) ANSELL G.B., DOHMEN H., J. Neurochem., 1957, 2, 1.

6) ANSELL G.B., SPANNER S., Nature, 1960, 185, 826.

7) ANSELL G.B., SPANNER S., Biochem. J., 1961, 79, 176.

8) ANSELL G.B., SPANNER S., Biochem. J., 1963, 88, 56.

9) ANSELL G.B., HAWTHORNE J.N., Phospholipids, Elsevier Publishing Company, 1964.

10) ANSELL G.B., METCALFE R.F., Biochem. J., 1966, 98, 22 P.

11) ANSELL G.B., SPANNER S., J. Neurochem., 1967, 14, 873.

12) ANSELL G.B., SPANNER S., Biochem. J., 1968, 110, 201.

13) AUGUST C., DAVISON A.N., WILLIAMS F., Biochem. J., 1961, 81, 818.

14) BAKAY L., Arch. Neurol. Psychiat., 1953, 70, 30.

15) BALAKRISHNAN S., GOODWIN H., CUMMINGS J., J. Neurochem., 1961, 8, 276.

16) BALLOU J.E., THOMSON J.R., J. Biol. Chem., 1956, 223, 745.

17) BIETH R., MANDEL P., Bull. Soc. Chim. Biol., 1950, 32, 109.

18) BIETH R., Thèse de Doctorat-ès-Sciences, Université de Strasbourg, 1951.

19) BIETH R., MANDEL P., C.R. Acad. Sciences, 1952, 235, 485.

20) BLIGH E.G., DYER W.J., Can. J. Biochem., 1959, 37, 911.

21) BÖHM P., RICHARZ G., Zeit. Physiol. Chem. Hoppe Seyler's, 1954, 298, 110.

22) BRAGANEA B.M., QUASTEL J.H., Biochem. J., 1953, 53, 88.

23) BRANTE G., Acta Physiol. Scand., 1949, 18, Suppl. 63.

24) BRIGGS A., J. Biol. Chem., 1922, 53, 13.

25) BROCKERHOFF H., BALLOU C.E., J. Biol. Chem., 1961, 236, 1909.

25a) BROCKERHOFF H., BALLOU C.E., Biochem. J., 1961, 81, 35 P.

26) BROCKERHOFF H., BALLOU C.E., J. Biol. Chem., 1962, 237, 49.

27) BROCKERHOFF H., BALLOU C.E., J. Biol. Chem., 1962, 237, 1764.

28) BROSSARD M., QUASTEL J.H., Can. J. Biochem., 1963, 41, 1243.

29) BURDICK C.J., STRITTMATTER C.F., Arch. Biochem. Biophys., 1965, 109, 293.

30) BURTON K., Biochem. J., 1956, 62, 315.

31) CARCINI P., BROCCODI F., MANZOLI F., Bol. Soc. It. Biol. Sper., 1965, 41, 1464.

32) CHANGUS G., CHAIKOFF J., RUBENS S., J. Biol. Chem., 1938, 126, 497.

33) CHEN P.S., TORIBARA T., WARNER H., Analyt., Chem., 1956, 28, 1756.

34) CHRISTL H., Zeit. Physiol. Chem. Hoppe Seyler's, 1953, 293, 83.

35) CHU L.W., J. Comp. Neurol., 1954, 100, 381.

36) COLODZIN M., KENNEDY E.P., J. Biol. Chem., 1965, 240, 3771.

37) COURTADES S., MARINETTI G.V., STOTZ E., Biochim. Biophys. Acta, 1967, 137, 121.

38) CRAIN S.M., Proc. Soc. Exp. Biol., 1952, 81, 49.

39) CUMINGS J.N., GOODWIN H., WOODWARD E.M., CURZON E.M., J. Neurochem., 1958, 2, 289.

40) CURZNER L., DAVISON A.N., Biochem. J., 1968, 106, 29.

41) DAVISON A.N., WAJDA M., J. Neurochem., 1959, 4, 353.

42) DAVISON A.N., MORGAN R., WAJDA M., PAYLING-WRIGHT G., J. Neurochem., 1959, 4, 360.

43) DAVISON A.N., DOBBING J., Biochem. J., 1959, 73, 701.

44) DAVISON A.N., DOBBING J., Biochem. J., 1960, 75, 565.

45) DAVISON A.N., DOBBING J., Biochem. J., 1960, 75, 571.

46) DAVISON A.N., CURZNER M., BANIK N., OXBERRY J., Nature, 1966, 212, 1373.

47) DAWSON R.M.C., RICHTER D., Proc. Roy. Soc. Ser. B., 1950, 137, 252.

48) DAWSON R.M.C., Biochem. J., 1953, 55, 507.

49) DAWSON R.M.C., Biochim. Biophys. Acta, 1954, 14, 374.

50) DAWSON R.M.C., Biochem. J., 1954, 57, 237.

51) DAWSON R.M.C., Biochemistry of the developping Nervous System ed. Waelsh H. Academic Press, New York (1955) p. 268.

52) DAWSON R.M.C., Biochem. J., 1960, 75, 45.

53) DAWSON R.M.C., HEMINGTON N., DAVENPORT J.B., Biochem. J., 1962, 84, 497.

54) DAWSON R.M.C., 2ème Meeting Fed. Europ. Biochem. Soc. Vienne 1965, Abstracts p. 249.

55) DAWSON R.M.C., EICHBERG J., Biochem. J., 1965, 96, 634.

56) DEBUCH H., Zeit. Physiol. Chem. Hoppe Seyler's, 1964, 338, 1.

57) DISCHE Z., Mikrochemie, 1930, 2, 4.

58) DITTMER J.C., DAWSON R.M.C., Biochem. J., 1961, 81, 535.

59) DITTMER J.C., DAWSON R.M.C., Biochem. J., 1961, 81, 540.

60) DZIEWIATKOWSKI D., BODIAN D., J. Cellular Comp. Physiol., 1950, 35, 141.

61) EDGAR G.W.F., Acta Anat., 1956, 27, 240.

62) EDGAR G.W.F., Acta Anat., 1957, 31, 451.

63) EDGAR G.W.F., Metabolism of the Nervous System ed. Richter D., Pergamon Press London, 1957, p. 101.

64) EDGAR G.W.F., SMITS G., J. Neurochem., 1959, 3, 316.

65) EICHBERG J., WHITTACKER V.P., DAWSON R.M.C., Biochem. J., 1964, 92, 91.

66) EICHBERG J., DAWSON R.M.C., Biochem. J., 1965, 96, 644.

67) EICHBERG J., HAUSER G., Biochim. Biophys. Acta, 1967, 144, 415.

68) El-EISHI H.I., J. Neurochem., 1967, 14, 405.

69) ELLIS R.B., HAWTHORNE J.N., Biochim. Biophys. Acta, 1961, 51, 385.

69a) ELLIS R.B., HAWTHORNE J.N., Biochem. J., 1962, 84, 19 P.

70) ELLIS R.B., GAILLARD T., HAWTHORNE J.N., Biochem. J., 1963, 88, 125.

71) ENG L.F., NOBLE E.P., Lipids, 1968, 3, 157.

72) FAURE M., Communication personnelle.

73) FEULGEN R., BERSIN Th., Zeit. Physiol. Chem. Hoppe Seyler's, 1939, 260, 217.

74) FLEISHER S., KLOUWEN H., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1961, 5, 378.

75) FLEISHER S., BRIERLEY S., KLOUWEN H., SLAUTTERBACH D.J., J. Biol. Chem., 1962, 237, 3264.

76) FOLCH J., J. Biol. Chem., 1942, 146, 35.

77) FOLCH J., J. Biol. Chem., 1949, 177, 497.

78) FOLCH J., Phosphorus Metabolism ed. Mc Elroy W.D. et Glass B., Baltimore, Vol. 2, 1952, p. 186.

79) FOLCH J., Biochemistry of the Developing Nervous System ed. H. Waelsh Academic Press, New York, 1955, p. 121.

80) FOLCH J., LEES M., SLOANE-STANLEY G., J. Biol. Chem., 1957, 226, 497.

81) FOLCH J., Fed. Proced., 1964, 23, 630.

82) FREYSZ L., BIETH R., MANDEL P., J. Physiol., 1964, 56, 353.

83) FREYSZ L., BIETH R., JUDES C., SENSENBRENNER M., JACOB M., MANDEL P., J. Neurochem., 1968, 15, 307.

84) FRIES B., CHANGUS G., CHAIKOFF J., J. Biol. Chem.,1940, 132, 23.

85) FRIES B., SCHACHNER M., CHAIKOFF J., J. Biol. Chem., 1942, 144, 59.

86) GARRIGAN G.W., CHARGAFF E., Biochim. Biophys. Acta, 1963, 70, 452.

87) GIACOBINI E., J. Neurochem., 1962, 9, 169.

88) GRADO C., BALLOU C.E., J. Biol. Chem., 1961, 236, 54.

89) GRAFNETTER D., GROSSI E., MORGANTE P., J. Neurochem., 1965, 12, 145.

90) HACK M.H., J. Biol. Chem., 1947, 169, 137.

91) HACK M.H., Biochem. J., 1953, 54, 602.

92) HAELD P.J., Phosphorus Metabolism of Brain Pergamon, Oxford, 1960.

93) HANAHAN D.J., TURNER M.B., JAYKO M.E., J. Biol. Chem., 1951, 192, 623.

94) HANAHAN D.J., Lipide Chemistry, John Wiley and Sons, New York, 1960.

95) HARTH S., BORKOWSKI T., MARDELL R., MANDEL P., Exptl. Cell. Res., 1962, 26, 587.

96) HAUSER G., Biochim. Biophys. Acta, 1963, 70, 278.

97) HAYASHI K., KANOH T., SHIMIZU S., KAI M., YAMAZOE S., J. Biochem. (Jap.), 1962, 3, 177.

98) HAYASHI K., NAKAMURA I., YAMAZOE S., J. Biochem. (Jap.), 1964, 56, 381.

99) HAYASHI K., YASHARA J., NAKAMURA I., YAMAZOE S., J. Biochem. (Jap.), 1966, 60, 42.

100) HÖLZL J., Biochem.Zeit., 1965, 41, 168.

101) HOKIN L.E., HOKIN M.R., J. Biol. Chem., 1958, 233, 818.

102) HOKIN L.E. HOKIN M.R., J. Biol. Chem., 1958, 233, 822.

103) HÖRHAMMER L., WAGNER H., HÖLZL J., Biochem. Zeit., 1958, 330, 173.

104) HÖRHAMMER L., WAGNER H., RICHTER G., Biochem. Zeit., 1958, 330, 591.

105) HÖRHAMMER L., WAGNER H., HÖLZL J., Biochem. Zeit., 1960, 232, 269.

106) HORROCKS L.A., ANSELL G.B., Biochem. J., 1965, 96, 48 P.

107) HORROCKS L.A., ANSELL G.B., Biochim. Biophys. Acta, 1967, 137, 90.

108) HORROCKS L.A., J. Neurochem., 1968, 15, 483.

109) HYDEN H., PIGON P., J. Neurochem., 1960, 6, 57.

110) HYDEN H., The Cell Vol. 4, Ed. Brachet J. Mirsky A.E., Academic Press, 1960, p. 215.

111) IVANOVA T.N., RUBEL L.N., SENNENOVA N.A., J. Neurochem., 1967, 14, 653.

112) JATZKEWITZ H., PILZ H., Naturwiss., 1964, 51, 61.

113) JOHNSON A.C., Mc NABB A.R., ROSSITER R.J., Biochem. J., 1948, 43, 573.

114) JOHNSON A.C., Mc NABB A.R., ROSSITER R.J., Biochem. J., 1949, 44, 494.

115) JOHNSTON P.V., ROOTS B.I., Biochem. J., 1966, 98, 157.

116) KAI M., HAWTHORNE J.N., Biochem. J., 1966, 98, 62.

117) KAI M., WHITE G.L., HAWTHORNE J.N., Biochem. J., 1966, 101, 328.

118) KAI M., SALWAY J.G., HAWTHORNE J.N., Biochem. J., 1967, 106, 791.

119) KATES M., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 41, 315.

120) KLENK E., BOEHM P., Zeit. Physiol. Chem., Hoppe Seyler's 1951, 288, 98.

121) KLENK E., DEBUCH H., DANN H., Zeit. Physiol. Chem., Hoppe Seyler's , 1953, 292, 244.

122) KOCH W., KOCH M.L., J. Biol. Chem., 1913, 15, 423.

123) KOREY S.R., Metabolism of the Nervous System ed. Richter D., Pergamon Press, London, 1957, p. 87.

124) KOREY S.R., ORCHEN M., Arch., Biochem. Biophys., 1959, 83, 381.

125) KREPS E.M., MANUKYAN K.G., PATRIKEEVA M.V., SMIRNOV A.A., CHENYKAERA B. Yu, CHIRKOVSKAYA E.V., Biochimya (Trad. Anglaise), 1964, 29, 944.

126) KREPS E.M., MANUKYAN K.G., PATRIKEEVA M.V., SMIRNOV A.A., CHENYKAERA B. Yu, CHIRKOVSKAYA E.V., Fed. Proced., 1966, 25, Suppl. T 277.

127) LARRABEE M.G., LEIGHT W.S., J. Neurochem., 1965, 12, 1.

128) LEA C.H., RHODES D.N., STOLL R.O., Biochem. J., 1955, 60, 353.

129) Le BARON F.N., FOLCH J., J. Neurochem., 1956, 1, 101.

130) Le BARON F.N., FOLCH J., Physiol. Revs., 1957, 37, 539.

131) Le BARON F.N., Mc DONALD C., SHRIDHARA., RAMARAO B., J. Neurochem., 1963, 10, 677.

132) Le BARON F.N., Intern. Neurochem., Conference Oxford, 1965, Abstr., p. 66.

133) LESCH P., MEIER S., Klin. Wschr., 1964, 42, 799.

134) LESCH P., MEIER S., BERNHARD K., Helv. Chim. Acta, 1966, 49, 791.

135) LESCH P., MEIER S., BERNHARD K., Helv. Chim. Acta, 1966, 49, 1215.

136) LESLIE I., DAWIDSON J., Biochim. Biophys. Acta, 1951, 7, 413.

137) LEVINE C., CHARGAFF E., J. Biol. Chem., 1962, 192, 465.

138) LIBERMAN C., Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1885, 18, 1803.

139) LOHMAN K., Biochem. Zeit., 1928, 194, 306.

140) LOWRY, Nature, 1959, 184, 433.

141) MACHEBOEUF M., DELSAL J., Bull. Soc. Chim. Biol.,1943, 25, 116.

142) MAGEE W., BERRY J., STRICKLAND K., ROSSITER R.J., Biochem. J., 1963, 88, 45.

143) MANDEL P., BIETH R., WEILL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1955, 37, 475.

144) MANDEL P., Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 173.

144a) MANDEL P., Bull. Soc. Chim. Biol., 1967, 49, 1491.

145) MANDEL P., NUSSBAUM J.L., J. Neurochem., 1966, 13, 629.

146) MANUKYAN K.G., SMIRNOV A.A., CHIRKOVSKAYA E.V., Biochimya (trad. Anglaise), 1962, 27, 727.

147) MANUKYAN K.G., SMIRNOV A.A., CHIRKOVSKAYA E.V., Biochimya (trad. Anglaise), 1963, 28, 196.

148) MANZOLI F., CARCINI P., Boll. Soc. It. Biol. Sper., 1964, 40, 127.

149) MANZOLI F., CARCINI P., Boll. Soc. It. Biol. Sper., 1965, 41, 1467.

150) MARGOLIS R., HELLE A., Biochim. Biophys. Acta, 1965, 98, 438.

151) MARINETTI G.V., STOTZ E., Biochim. Biophys. Acta, 1956, 21, 168.

152) MARINETTI G.V., WITTER R.F., STOTZ E., J. Biol. Chem., 1958, 226, 475.

153) MARINETTI G.V., J. Lip. Res., 1962, 3, 1.

154) MARREN T.H., J. of Pharm. and Exptl. Ther., 1960, 130, 126.

155) MARTIN J.B., DOTY D.M., Analyt. Chem., 1949, 21, 965.

156) MATSUMOTO M., MATSUMOTO R., FOLCH J., J. Neurochem., 1964, 11, 329.

157) Mc ARTHUR C.G., DOISY E.A., J. Comp. Neurol., 1919, 30, 445.

158) Mc ILLWAIN H., Biochemistry and the Central nervous system, 2 nd ed. Churchill London, 1959.

159) Mc KIBBIN J.M., TAYLOR W.E., J. Biol. Chem., 1952, 196, 427.

160) Mc MURRAY W.C., STRICKLAND K.P., BERRY J.F., ROSSITER R.J., Biochem. J., 1957, 66, 634.

161) Mc MURRAY W.C., J. Neurochem., 1964, 11, 287.

162) Mc MURRAY W.C., J. Neurochem., 1964, 11, 315.

163) MEJBAUM W., Zeit. Physiol. Chem., Hoppe Seyler's, 1937, 258, 117.

164) MEJBAUM W., Biokhimya, 1945, 10, 353.

165) MINDER W., ABELIN I., Zeit. Physiol. Chem. Hoppe Seyler's 1954, 298, 121.

166) NORTON T., AUTILLO L.A., J. Neurochem., 1966, 13, 213.

167) NURNBERGER J.I., Biology of Neuroglia, Ed. W.F. Windler C.C. Thomas, Springfield, 1958, p. 193.

168) NUSSBAUM J.L., BIETH R., MANDEL P., Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 395.

169) NUSSBAUM J.L., REBEL G., Bull. Soc. Chim. Biol., 1966, 48, 361.

170) O'BRIEN J.S., FILLERUP D.L., MEAD J.F., J. Lip. Res., 1964, 5, 329.

171) O'BRIEN J.S., SAMPSON E.L., J. Lip. Res., 1965, 6, 537.

172) O'BRIEN J.S., SAMPSON E.L., J. Lip. Res., 1965, 6, 545.

173) PAGE S.H., Chemistry of the Brain C.C. Thomas 1937, p.306.

174) PILZ H., MEHL E., Zeit. Physiol. Chem., Hoppe Seyler's, 1966, 346, 306.

175) PORGES E., SOJAK L., J. Neurochem., 1966, 13, 169.

176) POTTER V.R., ELVEJEHM C.A., J. Biol. Chem.,1936,114,495.

177) RAPPORT M., ALONZO N., J. Biol. Chem., 1960, 235, 1953.

178) REBEL G., Communication personnelle.

179) REBEL G., BIETH R., MANDEL P., Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 68.

180) REICH M., WAINIO W.W., J. Biol. Chem., 1961, 236, 3058.

181) ROBINS E., LOWRY O.H., EYDT K.M., Cannan. R.E., J. Biol. Chem., 1956, 220, 661.

182) ROMANOFF A.L., The avian Embryo The Mc Millan Company New York, 1960, p. 358.

183) ROOTS B.I., JOHNSTON P.V., J. Ultrastr. Res., 1964, 10, 350.

184) ROOTS B.I., JOHNSTON P.V., Biochem. J., 1965, 94, 61.

185) ROSE S.P.R., Nature, 1965, 206, 621.

186) ROSE S.P.R., Biochem. J., 1967, 102, 33.

187) ROSE S.P.R., Biochem. J., 1967, 102, 21 P.

188) ROSSITER R.J., Metabolism of the nervous system, ed. Richter D., Pergamon Oxford, 1957, p. 355.

189) ROSSITER R.J., PALMER F.B., Biochem. Zeit., 1965,342,337.

190) ROUSER G., KRITCHEVSKY G., HELLER D., LIEBER J., J. Am. oil. Chem. Soc., 1963, 40, 425.

191) ROUSER G., BAUMAN A.J., KRITCHEVSKY G., HELLER D., O'BRIEN J.S., J. Am. oil. Chem. Soc., 1964, 41, 836.

192) SASTRY P.S., KATES M., Biochemistry 1964, 3, 1274.

193) SATAKE M., ABE S., J. Biochem (Jap.), 1966, 57, 72.

194) SCHMIDT G., TANNHAUSER S.J., J. Biol. Chem., 1945, 161, 83.

195) SCHMIDT G., BENOTTI J., HERSCHMAN B., TANNHAUSER S.J., J. Biol. Chem., 1946, 166, 505.

196) SCOTT F.W., SETCHELL B.P., BASSET J.M., Biochem. J., 1966, 104, 1040.

197) SEKUZU I., JURTSANK P., GREEN D.E., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1961, 6, 71.

198) SEMINARIO L.M., HREN N., GOMEZ C.J., J. Neurochem.,1964, 11, 197.

199) SHELTAWY A., DAWSON R.M.C., Biochem. J., 1966, 100, 12.

200) SIEK T., NEWBURGH R., J. Lip. Res., 1965, 6, 552.

201) SLOANE-STANLEY G., Biochem. Soc. Symp. (Cambridge), 1952, 8, 44.

202) SMIRNOV A.A., CHIRKOVSKAYA E.V., MANUKYAN K.G.,Biochimya (trad. Anglaise), 1962, 26, 887.

203) SMITH M.E., Biochim. Biophys. Acta, 1968, 164, 285.

203a) SMITH M.E., ENG L.F., J. Am. oil. Chem. Soc., 1965, 42, 1013.

204) SOTO E.F., SEMINARIO de BOHNER L., CALVIUS M., J. Neurochem., 1966, 13, 989.

205) SPERRY W., Biochemistry of the developing Nervous system ed. Waelsh H., Academic Press New York, 1955, p. 261.

206) STRICKLAND K., Can. J. Med. Scien., 1952, 30, 484.

207) STAMMLER A., STAMMLER V., DEBUCH H., Zeit. Physiol. Chem. Hoppe Seyler's, 1954, 296, 80.

208) SVENNERHOLM L., THORIN M., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 41, 371.

209) THUDICHUM J.L.W., A Treatise on the Chemical Constitution of the Brain, Ballière Dindall and Cox,London,1884.

210) THUDICHUM J.L.W., Die Chemische Konstitution des Gehirns. Pietzker Tübingen, 1901.

211) TOMLINSON R.V., BALLOU C.E., J. Biol. Chem., 1961, 236, 1902.

212) TORWIK A., SIDMAN R., J. Neurochem., 1965, 12, 555.

213) UZMAN L., RUMLEY M., J. Neurochem., 1958, 3, 170.

214) VAUQUELIN L.N., Ann. Mus. Hist. Nat., 1811, 18. 212.

215) VAUQUELIN L.N., Ann. Chim., 1812, 81, 37.

216) VIGNAIS P., VIGNAIS P., LEHNINGER A., J. Biol. Chem., 1964, 239, 2002.

217) VIGNAIS P., VIGNAIS P., LEHNINGER A., J. Biol. Chem., 1964, 239, 2011.

218) VOLPE P., GIUDITTA A., Nature, 1967, 216, 154.

219) VOLPE P., GIUDITTA A., Brain Res., 1967, 6, 228.

220) WAGELIN J., MANZOLI F.A., J. Neurochem., 1967, 14, 1161.

221) WAGNER H., HÖLZL J., LISSAU Ä., HÖRHAMMER L., Biochem. Zeit., 1961, 333, 511.

222) WAGNER H., LISSAU Ä., HÖLZL J., HÖRHAMMER L., J. Lipid. Res., 1962, 3, 177.

223) WAGNER H., HÖLZL J., LISSAU Ä., HÖRHAMMER L., Biochem. Zeit., 1963, 339, 34.

224) WEBSTER G., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 44, 109.

225) WELLS M.A., DITTMER J.C., Biochemistry, 1965, 4, 2459.

226) WELLS M.A., DITTMER J.C., Biochemistry, 1966, 5, 3405.

227) WELLS M.A., DITTMER J.C., Biochemistry, 1967, 6, 3169.

228) WINTZERITH M., Thèse de Doctorat-ès-Sciences, Université de Strasbourg (1965).

229) WITTCOFF M., The Phosphatides Reinhold New York, 1951.

230) WITTENBERG J., KOREY S.R., SWENSON F., J. Biol. Chem., 1956, 219, 40.

231) WREN J.J., J. Chromato., 1960, 4, 173.

232) YBEMA J., LEIJNSE B., K. Nederl. Akad. Wetensch. Proc., Serie C, 1960, 63, 652.

233) ZILVERSMIT D., ENTENMAN C., FISHLER M., CHAIKOFF J., J. gen. Physiol.,1943, 26, 333.

Strasbourg, le 30 Avril 1969

Le Président du Jury,

Professeur J.P. EBEL.

Vu et Permis d'imprimer

Strasbourg, le 7 Mai 1969

LE DOYEN,

J.H. VIVIEN.